



**M** 2014

# **Presença de Bactérias coliformes e Escherichia coli resistentes aos antibióticos Ciprofloxacina e Estreptomicina em água natural**

**ANDRÉ MANUEL GUIMARÃES GRANJA CORREIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM  
MESTRADO INTEGRADO ENGENHARIA QUÍMICA

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## *Presença de Bactérias coliformes e Escherichia coli resistentes aos antibióticos Ciprofloxacina e Estreptomicina em água natural*

### Tese de Mestrado

de

André Manuel Guimarães Granja Correia

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

Orientador na FEUP: Prof<sup>a</sup>. Olga Nunes

Co-Orientador: Dr<sup>a</sup>. Margarida Valente



Departamento de Engenharia Química

17 de março de 2014

“Tudo o que é bom dura o tempo necessário para ser inesquecível”  
Fernando Pessoa



## Agradecimentos

No final desta caminhada são muitas as pessoas a quem tenho de agradecer.

Começo pelos meus pais e pela Marta, pois sem o apoio deles nada seria possível, sempre estiveram do meu lado e neste momento ainda mais importante tem sido a sua presença e ajuda.

Queria agradecer a toda a equipa do laboratório pela colaboração, tanto pelo apoio nas tarefas como nos momentos de descontração, mostrando que boa disposição e trabalho podem coexistir.

Um obrigado muito especial aos meus colegas de equipa, Carol, Joana, Manel e Maria João, pela ajuda, pelo trabalho, mas sobretudo pelo carinho, pelo companheirismo, paciência e bom ambiente. Sem vocês, seria bem mais difícil e menos divertido...

Uma palavra de apreço para a Rita Reis pela sua disponibilidade durante todo o processo de Dissertação, pois sem a sua ajuda ainda hoje poderia estar à espera.

Ao Marcos, ao Lagarteira, à Ana e a todos os meus amigos que compreenderam a minha situação e me apoiaram durante esta caminhada. As vossas palavras não foram esquecidas, muito obrigado pela motivação.

À Ivone Moreira pelas dicas, pelos antibióticos e por sempre estar disponível para ajudar.

Por último queria agradecer às minhas orientadoras, a Professora Olga e em especial à Dr<sup>a</sup>. Margarida Valente, pela disponibilidade, esclarecimentos e conhecimento transmitido.

Um obrigado a todos que diretamente, ou indiretamente contribuíram para tornar mais fácil esta caminhada.



## Resumo

A água é um recurso extremamente importante para todos os seres vivos. O conhecimento das características dos cursos de água onde exista captação destinada à produção de água para consumo humano é particularmente importante para garantir a qualidade da água de abastecimento às populações. Uma característica da água no seu estado natural que tem vindo a ganhar destaque nos últimos anos, com a elaboração de vários estudos sobre o tema, é a presença de bactérias resistentes a antibióticos.

Este estudo tem como objetivo avaliar a prevalência de bactérias coliformes e *Escherichia coli* (*E. coli*) resistentes aos antibióticos ciprofloxacina e estreptomicina no Rio Douro.

A prevalência média de bactérias coliformes que toleraram uma concentração de ciprofloxacina a 2 mg/L foi de 12,6%, sendo de apenas de 0,1% quando na presença de 150 mg/L deste antibiótico. Quanto à população de *E. coli* obteve-se uma prevalência média de 20,9% e de 0,2% para concentrações de 2 mg/L e 150 mg/L, respetivamente.

Os valores de prevalência média de bactérias coliformes para a estreptomicina foram de 4,9% para uma concentração de 250 mg/L e 0,1% para uma concentração de 900 mg/L. Para *E. coli*, os valores da taxa de prevalência média variaram entre os 7,7% e os 0,2% para concentrações de estreptomicina de 250 mg/L e 600 mg/L, respetivamente.

**Palavras-Chave:** Bactérias coliformes; *Escherichia coli*; ciprofloxacina; estreptomicina; Prevalência; Resistência; Rio Douro.





## Abstract

Water is an extremely important resource for all living beings. Knowledge of the characteristics of watercourses where there are captures for production of drinking water is particularly important to ensure the quality of the water supply to the population. A feature of water in its natural state that has gained prominence in recent years with the development of several studies on the topic, is the presence of antibiotic-resistant bacteria. This study aims to evaluate the presence of coliform bacteria and *Escherichia coli* in the Douro River and to evaluate their prevalence to antibiotics ciprofloxacin and streptomycin.

The average prevalence of coliform bacteria which tolerate ciprofloxacin at concentration of 2 mg/L was 12.6%, with only a prevalence of 0.1% in the presence of 150 mg/L. The population of *E. coli* was obtained an average prevalence of 20.9% and 0.2% at concentrations of 2 mg/L and 150 mg/L, respectively.

The average prevalence values for coliform bacteria are 4.9% to streptomycin at 250 mg/L and 0.1 to a concentration of 900 mg/L. For *E. coli*, the average prevalence rate ranged between 7.7% and 0.2% for values of streptomycin of 250 mg/L and 600 mg/L, respectively.

**Keywords:** Coliform bacteria; *Escherichia coli*; ciprofloxacin; streptomycin; Prevalence; Resistance; Rio Douro.



## Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

*(André Correia)*



# Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Objetivo do Trabalho.....	1
1.2	Bacia Hidrográfica do Rio Douro .....	1
1.3	O ciclo urbano da água.....	3
1.3.1	Água para consumo humano .....	5
1.3.2	Técnicas de tratamento de água potável .....	5
1.4	Qualidade bacteriológica da água .....	6
1.4.1	Bactérias coliformes .....	7
1.5	Resistência aos Antibióticos na Natureza .....	8
1.5.1	Mecanismos de resistência e disseminação .....	9
1.5.2	Ciprofloxacina.....	11
1.5.3	Estreptomicina .....	11
1.6	Organização da Tese .....	12
2	Materiais e Métodos.....	13
2.1	Colheita de amostras.....	13
2.2	Análise Microbiológica.....	13
2.2.1	Meios de Cultura, Reagentes, Microrganismos e Antibióticos .....	13
2.3	Equipamento e Materiais .....	14
2.4	Preparação do meio seletivo .....	15
2.5	Pesquisa e Quantificação - Método de filtração por membrana .....	15
2.5.1	Sementeira e Incubação .....	15
2.5.2	Confirmação Bioquímica.....	16
2.5.3	Enumeração .....	19
2.6	Identificação Bioquímica - Sistema Comercial.....	19
2.7	Taxa de Prevalência .....	21
2.8	Controlo de Qualidade .....	21
2.8.1	Controlo Qualitativo .....	21
2.8.2	Controlo Quantitativo.....	22

2.8.3	Duplicados de Análises .....	23
2.8.4	Testes de Esterilidade .....	23
3	Resultados e Discussão .....	25
3.1	Análises Efetuadas .....	25
3.2	Caraterização da população.....	25
3.3	Bactérias resistentes a Ciprofloxacina .....	28
3.3.1	Identificação Bioquímica - Sistema Comercial .....	32
3.4	Bactérias resistentes a Estreptomicina .....	33
3.4.1	Identificação Bioquímica - Sistema Comercial .....	37
3.5	Controlo de Qualidade .....	38
3.5.1	MR - Controlo Qualitativo .....	38
3.5.2	Controlo Quantitativo.....	39
3.5.3	Análise de duplicados .....	40
3.5.4	Testes de esterilidade .....	43
4	Conclusões.....	44
4.1	Limitações e Trabalho Futuro .....	44
4.2	Outros Trabalhos Realizados .....	45
4.3	Apreciação final.....	45
5	Referências.....	46
Anexo A	- Análises Efetuadas .....	50
A.1.	Meio sem Antibiótico (LSA) .....	50
A.2.	Ciprofloxacina .....	51
A.3	Estreptomicina (baixas concentrações) .....	53
A.4	Estreptomicina (Altas concentrações).....	55
Anexo B	- Precipitação e Turvação.....	56
Anexo C	- Tabelas de Resultados .....	57
C.1.	Ciprofloxacina .....	57
C.2.	Estreptomicina (Baixas concentrações).....	60
C.3.	Estreptomicina (Altas Concentrações) .....	62
Anexo D.	Tabelas de duplicados .....	65

Anexo E. Modelos Microgen™ .....	67
E.1. Testes e tabelas de cores. ....	67
E.2. Identificações Ciprofloxacina .....	68
E.3. Identificações Estreptomicina .....	70
E.4. Exemplos <i>Output sotfware</i> Microgen™-ID .....	72

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Barragem e albufeira de Crestuma-Lever. (Retirado de (VALLEY, 2011) ) .....	1
<b>Figura 2</b> - Bacia Hidrográfica do rio Douro. (Retirado de (APA, 2012)).....	2
<b>Figura 3</b> - Fontes poluidoras na Bacia Hidrográfica do rio Douro. (Adaptado de (LEITE, 2008)) 2	
<b>Figura 4</b> - O Ciclo Urbano da água. (Adaptado de(MARSALEK et al., 2006)).....	4
<b>Figura 5</b> - <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (estirpe patogénica) ampliada por microscópio eletrónico. (Retirado de (COUNSEL, 2009)).....	8
<b>Figura 6</b> - Mecanismos de aquisição de resistência a antibióticos (a) e disseminação na comunidade ao longo do tempo (b). As setas indicam os processos de transferência horizontal de genes e R indica resistência adquirida. (Adaptado de (MANAIA et al., 2011)) .....	10
<b>Figura 7</b> - Estrutura química da ciprofloxacina. (Retirado de (BAX et al.) .....	11
<b>Figura 8</b> - Estrutura química da estreptomicina. (Retirado de (CHEMICALBOOK, 2010)) .....	12
<b>Figura 9</b> - a)Recipientes usados para a colheita de amostras; b) Mala de transporte das amostras. ....	13
<b>Figura 10</b> - a) Método de filtração; b) Pormenor da membrana na placa de LSA; c) Aspeto típico da placa após incubação.....	15
<b>Figura 11</b> - Método de sementeira de bactérias coliformes.....	16
<b>Figura 12</b> - Aspeto de um papel de filtro apresentando colónias com resultado positivo e negativo. ....	17
<b>Figura 13</b> - Confirmação de bactérias coliformes e <i>E. coli</i> .....	17
<b>Figura 14</b> - Tubo de Fluorocult a ser inoculado.....	18
<b>Figura 15</b> - a) Teste de Fluorescência; b) Tubos de Fluorocult com reação carmim. ....	18
<b>Figura 16</b> - Inoculação de uma galeria. ....	20
<b>Figura 17</b> - Exemplo de Modelo Microgen <sup>TM</sup> para registo dos resultados.....	20
<b>Figura 18</b> - Pormenor da membrana com crescimento de bactérias a baixa concentração (8 mg/L) (a) e membrana com crescimento de bactérias a alta concentração de ciprofloxacina (120 mg/L) (b). ....	32
<b>Figura 19</b> - Pormenor da membrana com crescimento de bactérias em meio sem antibiótico (a) e membrana com crescimento de bactérias a concentração de estreptomicina (250 mg/L) (b). ....	37
<b>Figura 20</b> - Indicação das cores dos testes de confirmação bioquímica (Adaptado de (MICROGEN, 2011)).....	68



# Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> - Bactérias totais, bactérias coliformes e <i>E. coli</i> no Rio Douro. ....	26
<b>Gráfico 2</b> - Precipitação Turvação água na albufeira nos meses em que decorreu o estudo...27	27
<b>Gráfico 3</b> - Número de UFC/100 mL para bactérias totais, bactérias coliformes e <i>E. coli</i> vs. turvação da água natural. ....	28
<b>Gráfico 4</b> - Média de UFC/100 mL para diferentes concentrações de ciprofloxacina. (Na caixa foram apresentados os mesmos valores, mas ampliados.).....	29
<b>Gráfico 5</b> - Proporção de bactérias coliformes e <i>E. coli</i> relativamente às bactérias totais no estudo com ciprofloxacina. ....	30
<b>Gráfico 6</b> - Comparação entre o número de bactérias totais e o número de bactérias totais resistentes a ciprofloxacina. ....	30
<b>Gráfico 7</b> - Comparação entre o número de bactérias coliformes e o número de bactérias coliformes resistentes a ciprofloxacina. ....	31
<b>Gráfico 8</b> - Comparação entre o número de <i>E. coli</i> e o número de <i>E. coli</i> resistentes a ciprofloxacina. ....	31
<b>Gráfico 9</b> - Média de UFC/100 mL para diferentes concentrações de estreptomicina. (Na caixa foram apresentados os mesmos valores, mas ampliados.).....	34
<b>Gráfico 10</b> - Proporção de bactérias coliformes e <i>E. coli</i> relativamente às bactérias totais no estudo com estreptomicina. ....	35
<b>Gráfico 11</b> - Comparação entre o número de bactérias totais e o número de bactérias totais resistentes a estreptomicina. ....	35
<b>Gráfico 12</b> - Comparação entre o número de bactérias coliformes e o número de bactérias coliformes resistentes a estreptomicina. ....	36
<b>Gráfico 13</b> - Comparação entre o número de <i>E. coli</i> e o número de <i>E. coli</i> resistentes a estreptomicina. ....	36
<b>Gráfico 14</b> - Carta Guia de <i>K. oxytoca</i> para meio LSA sem antibiótico.....	39
<b>Gráfico 15</b> - Carta Guia de <i>E. coli</i> para meio LSA sem antibiótico. ....	40
<b>Gráfico 16</b> - Amplitude dos duplicados de gama baixa de bactérias coliformes realizados durante o estudo.....	41
<b>Gráfico 17</b> -Amplitude dos duplicados de gama alta de bactérias coliformes realizados durante o estudo. ....	42
<b>Gráfico 18</b> -Amplitude dos duplicados de gama baixa de <i>E. coli</i> realizados durante o estudo.	42
<b>Gráfico 19</b> - Amplitude dos duplicados de gama alta de <i>E. coli</i> realizados durante o estudo.	43

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de mecanismos de ação e resistência encontrados em bactérias para diferentes agentes antimicrobianos. (Adaptado de (MANAIA et al., 2011)).....	9
<b>Tabela 2</b> - Características dos antibióticos. (Adaptado (APPLICHEM, O'NEIL, 2013, SIGMA-ALDRICH, 1997)). .....	14
<b>Tabela 3</b> - Resumo dos dados de contagem absoluta. ....	25
<b>Tabela 4</b> - Taxas de prevalência média das bactérias para ciprofloxacina. ....	29
<b>Tabela 5</b> - Resultados da identificação bioquímica com Microgen®-ID para bactérias resistentes a ciprofloxacina.....	33
<b>Tabela 6</b> - Taxas de prevalência média das bactérias para estreptomicina. ....	34
<b>Tabela 7</b> - Resultados da identificação bioquímica com Microgen®-ID para bactérias resistentes a estreptomicina.....	38
<b>Tabela 8</b> - Resultados do controlo qualitativo para <i>E. coli</i> e <i>K. oxytoca</i> . ....	39
<b>Tabela 9</b> - Resultados do controlo quantitativo para <i>E. coli</i> e <i>K. oxytoca</i> . ....	40
<b>Tabela 10</b> - Critérios precisão para duplicados. ....	41
<b>Tabela 11</b> - Valores para as diversas contagens totais em LSA. ....	50
<b>Tabela 12</b> - Análises efetuadas em meio LSA com ciprofloxacina.....	51
<b>Tabela 13</b> - Análises efetuadas em meio LSA com estreptomicina (Baixas Concentrações). ...	53
<b>Tabela 14</b> - Análises efetuadas em meio LSA com estreptomicina (Altas Concentrações). ....	55
<b>Tabela 15</b> - Valores diários de Precipitação e Turvação da amostra. ....	56
<b>Tabela 16</b> - UFC para todas as análises efetuadas com ciprofloxacina.....	57
<b>Tabela 17</b> - Proporção de bactérias coliformes e <i>E. coli</i> relativamente às bactérias totais para diferentes concentrações de ciprofloxacina. ....	58
<b>Tabela 18</b> - Valores de prevalência para diferentes concentrações de ciprofloxacina. ....	59
<b>Tabela 19</b> - UFC para todas as análises efetuadas com estreptomicina (Baixas Concentrações). ....	60
<b>Tabela 20</b> - Proporção de bactérias coliformes e <i>E. coli</i> relativamente às bactérias totais para diferentes concentrações de estreptomicina (Baixas Concentrações). ....	60
<b>Tabela 21</b> - Valores de prevalência para diferentes concentrações de estreptomicina (Baixas Concentrações). ....	61
<b>Tabela 22</b> - - UFC para todas as análises efetuadas com estreptomicina (Altas Concentrações). ....	62

<b>Tabela 23</b> - Proporção de bactérias coliformes e E. coli relativamente às bactérias totais para diferentes concentrações de estreptomicina (Altas Concentrações).....	63
<b>Tabela 24</b> - Valores de prevalência para diferentes concentrações de estreptomicina (Altas Concentrações) .....	64
<b>Tabela 25</b> - Valores de duplicados de Gama baixa para bactérias coliformes e E. coli. ....	65
<b>Tabela 26</b> - Valores de duplicados de Gama baixa para bactérias coliformes e E. coli. ....	66
<b>Tabela 27</b> - Testes e reações da galeria Gn-A para identificação bioquímica (Adaptado de {Microgen, 2011 #7048}). ....	67
<b>Tabela 28</b> - Testes e reações da galeria Gn-B para identificação bioquímica(Adaptado de {Microgen, 2011 #7048}). ....	67

## Notação

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CIP	Ciprofloxacina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETA	Estação Tratamento Águas
ETAR	Estação Tratamento Águas Residuais
INE	Instituto Nacional Estatística
LSA	Lauril Sulfato agar
LI <sub>R</sub>	Limite Inferior de Reprodutibilidade
LS <sub>R</sub>	Limite Superior de Reprodutibilidade
MRC	Material de Referência Certificado
MRD	<i>Maximum Recovery Diluent</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MD	Material de Referência
NTU	Unidades Nefelométricas de Turbidez
NCTC	National Collection of Type Cultures
ARN	Ácido ribonucleico
STR	Estreptomicina
TSA	Tryptona Soja Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta
THM	Trihalometanos

# 1 Introdução

## 1.1 Objetivo do Trabalho

O presente estudo tem como objetivo avaliar a existência e quantificar bactérias coliformes e *E. coli* resistentes a dois antibióticos (ciprofloxacina e estreptomicina) em água natural.

A água da albufeira de Crestuma-Lever (Figura 1) no rio Douro é utilizada como origem para a produção de água para consumo humano destinando-se a cerca de 1,6 milhões de habitantes (ADDP, 2012). Por este motivo foi escolhido este local para a colheita de amostras para análise no presente estudo.



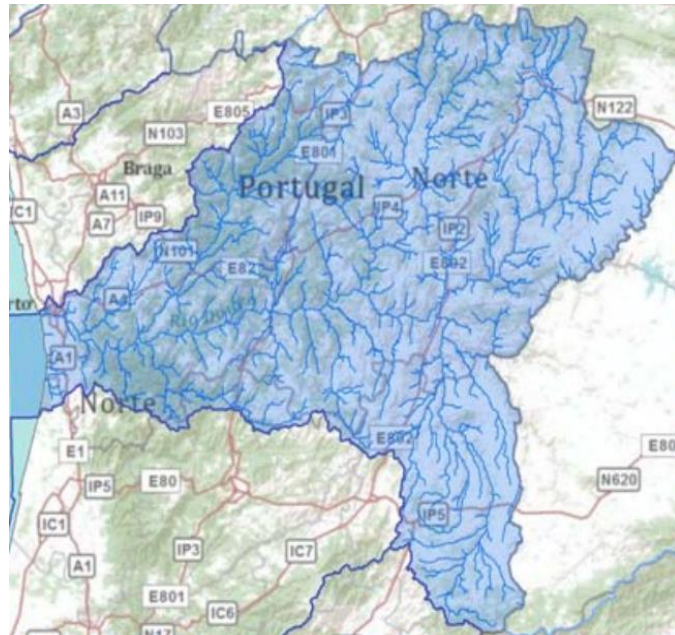
*Figura 1 - Barragem e albufeira de Crestuma-Lever. (Retirado de (VALLEY, 2011) )*

## 1.2 Bacia Hidrográfica do Rio Douro

O rio Douro nasce na serra de Urbión a cerca de 1700 m de altitude. Ao longo do seu curso de 927 km atravessa o território espanhol numa extensão de 597 km e serve de fronteira ao longo de 122 km, sendo os últimos 208 km percorridos em Portugal até à foz no Oceano Atlântico, entre as cidades do Porto e de Gaia (APA, 2012).

A altitude média do rio é de 700 m, devido à zona geográfica onde corre, o rio apresenta um desnível elevado com curvas apertadas, rochas salientes, várias irregularidades e rápidos.

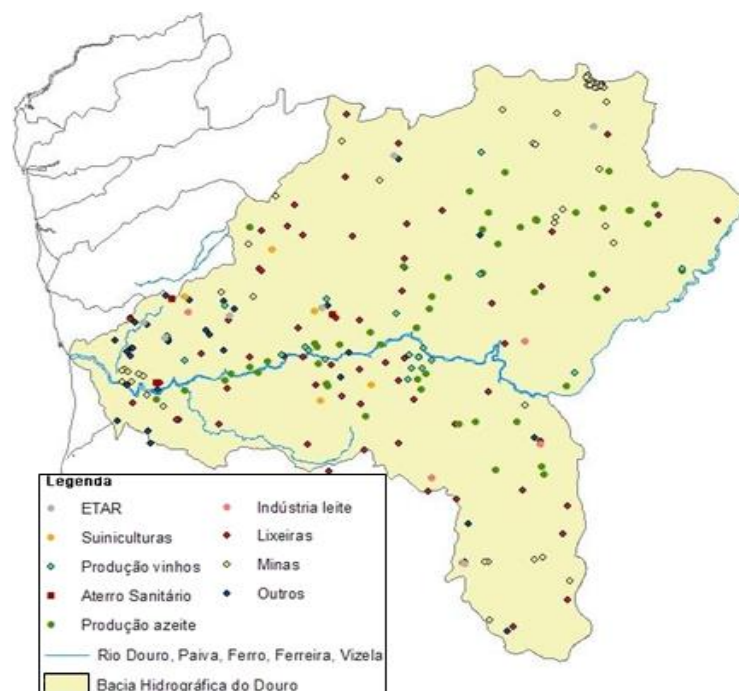
Aproveitando o elevado desnível, principalmente na zona do Douro Internacional (desnível médio de 3 m/km), foi levado a cabo o aproveitamento hidroelétrico do rio a partir de 1961 (CARNEIRO, 2012). A região hidrográfica do Douro possui uma área de aproximadamente 79 000 km<sup>2</sup>. Destes, 19 000 km<sup>2</sup> são em território nacional com uma população de cerca de 2 milhões de habitantes. Neste território, encontram-se 383 massas de água superficiais, distribuídas pelas seguintes categorias: 361 rios, 17 albufeiras, 3 águas de transição e 2 águas costeiras. Estão igualmente identificadas três massas de água subterrâneas (Figura 2) (APA, 2012).



**Figura 2 - Bacia Hidrográfica do rio Douro. (Retirado de (APA, 2012))**

A população residente na bacia hidrográfica do Douro representa quase 20% da população de Portugal Continental situando-se, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Estatística (INE), nos 1 968 896 habitantes em 2008, a que acresce a população flutuante, estimada em 48 306 habitantes-equivalente. No que respeita à distribuição da população residente, o total apresentado corresponde a uma densidade populacional de 104 habitantes por km<sup>2</sup> em 2008 (APA, 2012).

Nesta bacia hidrográfica existem várias fontes poluidoras capazes de contaminar a água com uma grande variedade de poluentes. A Figura 3 representa um cadastro da maioria das fontes poluidoras da bacia hidrográfica feito em 2008.



**Figura 3 - Fontes poluidoras na Bacia Hidrográfica do rio Douro. (Adaptado de (LEITE, 2008))**

Os compostos farmacêuticos foram reconhecidos como uma preocupação principal na contaminação de ambientes aquáticos (KHETAN and COLLINS, 2007, KUMMERER, 2004), sendo que, neste caso, as potenciais fontes de contaminação são Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), suiniculturas, aquiculturas, aterros sanitários e lixeiras.

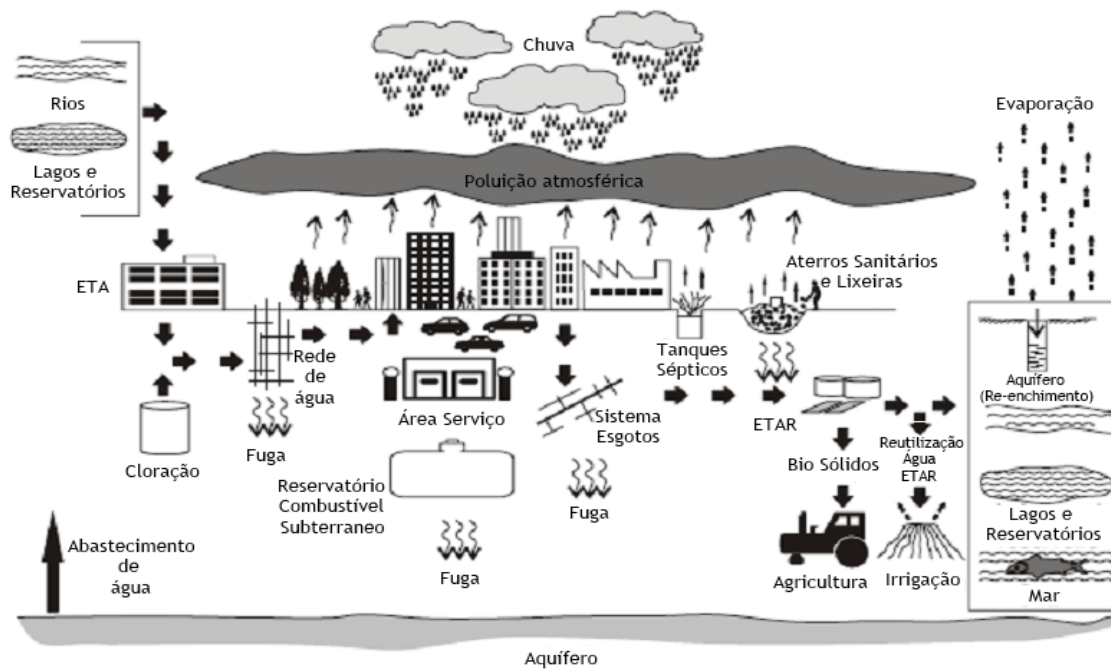
Estes e os seus derivados são continuamente libertados no meio ambiente, pelas mais diversas vias, desde rejeição de medicamentos não usados e/ou fora de prazo de validade, descargas de ETAR's, excreção por humanos, efluentes de hospitais (Portugal é o 4º país a nível europeu com maior consumo de antibióticos em ambulatório (SANDE-BRUINSMA *et al.*, 2008)), produção de produtos farmacêuticos, aquacultura e agricultura (com utilização de bio sólidos) (BAQUERO *et al.*, 2008, MADUREIRA *et al.*, 2010).

Criam-se assim condições favoráveis para a seleção, propagação e persistência de bactérias resistentes a antibióticos causando infeções em animais e humanos através da cadeia alimentar (BAHIRU *et al.*, 2013).

As ETAR não foram projetadas para degradar moléculas orgânicas em baixos níveis de concentração, pelo que é observada a introdução de muitos compostos farmacêuticos em ambientes aquáticos. Como resultado, quando massas de água são contaminadas com bactérias resistentes a agentes antimicrobianos, estas podem servir como fonte e/ou reservatório de elementos genéticos que codificam a resistência e que podem ser transferidos para outras bactérias, tornando assim a água perigosa para a saúde pública (BAHIRU *et al.*, 2013).

### 1.3 O ciclo urbano da água

A água é o composto químico mais comum e importante na Terra, com uma inquestionável importância para a saúde humana e o bem-estar. O ciclo hidrológico, muitas vezes referido como o ciclo da água, este inclui armazenamento e circulação de água entre a biosfera, atmosfera, litosfera e hidrosfera. Devido à grande influência humana, foi proposto um ciclo da água mais restrito, o ciclo urbano da água (Figura 4). Este ciclo combina a hidrologia com a intervenção humana. A influência do Homem advém essencialmente da sua necessidade de água de abastecimento (para tomar banho, limpeza, bebidas e preparação de alimentos) e da produção de águas residuais. Assim, no ciclo urbano da água, é possível reconhecer duas partes complementares - água destinada ao consumo humano e a resultante de atividades humanas (VAZ-MOREIRA, 2012).



**Figura 4-** O Ciclo Urbano da água. (Adaptado de(MARSALEK et al., 2006))

O ciclo da água destinada ao consumo humano inclui a fonte de água, normalmente superficial (rios, lagoas, poços aluviais) ou subterrânea, as Estações de Tratamento de Água (ETA) e as redes de distribuição que podem atingir vários quilômetros. As águas residuais, incluindo as de origem doméstica, industrial ou hospitalar, antes de serem lançadas no meio ambiente são submetidas a tratamento, a fim de remover o excesso de matéria orgânica e de diversos tipos de contaminantes. Com este fim, os efluentes são recolhidos em ETAR antes da descarga em cursos de água natural. Embora não seja possível seguir o destino dos efluentes tratados no ambiente, uma contaminação hipotética da água destinada ao consumo humano por estes efluentes não pode ser descartada (VAZ-MOREIRA, 2012).

Por definição, a água potável é a adequada para o ser humano consumir na lavagem/banho e preparação de alimentos (98/83/CE, 1998, WHO, 2008). Os aspetos que afetam a conformidade de água potável incluem fatores químicos e microbiológicos que podem afetar a saúde dos consumidores, por ingestão, contacto ou inalação de aerossóis (LEE *et al.*, 2002, WHO, 2008). A qualidade da água pode ser afetada em diferentes partes do seu ciclo, conforme descrito na Figura 4. Se é certo que o tratamento de água potável pode melhorar largamente a qualidade e a segurança da água, é também observado que a eficiência do tratamento e a qualidade final da água depende das características da água natural. Com efeito, a contaminação de águas superficiais com fertilizantes, pesticidas, produtos farmacêuticos ou metais pesados pode comprometer seriamente a qualidade final da água potável (VAZ-MOREIRA, 2012, WHO, 2011).



### 1.3.1 Água para consumo humano

De acordo com a definição de água potável, a qualidade microbiológica da água é um indicador importante da sua qualidade. Com efeito, as bactérias patogénicas, vírus, protozoários e helmintos são o fator de risco mais comum para a saúde associado à água potável. Assim, a pesquisa da presença de contaminação fecal é recomendada. De acordo com a norma Europeia (98/83/CE, 1998) e a legislação nacional (DL\_306/2007, 2007), a água fornecida para consumo humano deve ser isenta de bactérias coliformes, *Enterococcus* e *Clostridium perfringens* cultivável em 100 mL de água.

As bactérias são geralmente sensíveis à inativação pela desinfecção, mas algumas patogénicas conseguem por vezes persistir, acabando por ser transmitidas através da água - *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori* (MARSALEK *et al.*, 2006, RUSIN *et al.*, 1997).

Para garantir a qualidade da água, são utilizados vários processos de tratamento dentro de uma ETA para garantir a qualidade da água potável (MARSALEK *et al.*, 2006, WHO, 2008).

### 1.3.2 Técnicas de tratamento de água potável

A água natural possui um grande número de compostos orgânicos e inorgânicos pelo que são necessários tratamentos capazes de remover tais impurezas. Normalmente o tratamento de águas naturais para consumo engloba 3 etapas fundamentais: Tratamento primário, secundário e terciário. Segue-se uma pequena explicação de como estes processos ocorrem, mostrando exemplos de técnicas utilizadas em cada um dos tratamentos.

#### Tratamento Primário (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2003)

- **Sedimentação:** Remoção de sólidos suspensos. Separação de partículas sólidas em suspensão por ação da gravidade.
- **Flotação:** Operação unitária para separar sólidos pouco densos e gorduras da fase líquida. Esta separação deve-se sobretudo à introdução de bolhas no líquido que promovem a flutuação dos materiais a separar. Estes materiais são recolhidos por raspadores de superfície.
- **Filtração:** Processo de filtração (normalmente pressurizada) em que a água passa em filtros (areia, antracite, carvão ativado) para reduzir sólidos suspensos.

#### Tratamento Secundário (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2003)

O tratamento secundário consiste na remoção da matéria orgânica ainda existente na água. Recorre sobretudo a técnicas de **Coagulação/Floculação**. A coagulação consiste na aglomeração de matéria orgânica com a ajuda de coagulantes (e.g. sulfato de alumínio). O processo de floculação consiste na aglutinação das partículas anteriormente formadas. Assim as partículas podem ser mais facilmente removidas, recorrendo à flutuação ou sedimentação.

A remoção de matéria orgânica pode ser maximizada quando se aplicam processos de oxidação química.

**Tratamento Terciário (ASSOCIATION and EDZWALD, 2010, TCHOBANOGLOUS et al., 2003)**

Neste processo pretende-se remover poluentes que ainda não foram removidos na etapa anterior (principalmente microrganismos). Para um tratamento eficaz deve ser garantida a remoção de 99,9% de *E. coli* (98/83/CE, 1998). Estes tratamentos recorrem a desinfetantes, tais como o cloro, ozono ou radiação ultravioleta (UV).

- **Cloro e derivados:** Estes compostos possuem a vantagem de serem económicos, quando comparado com os restantes, de terem capacidade de deixar quantidades residuais, o que permite uma desinfeção contínua ao longo do tempo, e serem de fácil aplicação. No entanto, a reação entre a matéria orgânica e estes compostos pode dar origem a subprodutos organoclorados, como por exemplo, os trihalometanos (THM), os ácidos haloacéticos ou os haloacetónitros.
- **Ozono:** Tem excelentes propriedades desinfetantes visto que oxida um grande número de contaminantes orgânicos, no entanto pode produzir subprodutos prejudiciais ao ser humano (e.g. aldeídos). Apresenta maior custo que o cloro e não garante uma desinfeção contínua ao longo do tempo.
- **Radiação UV:** A radiação UV é bastante eficaz, pois provoca a alteração do ADN dos microrganismos, ficando estes impossibilitados de desenvolver mecanismos de defesa. Para além do elevado custo, não previne o crescimento microbiológico a jusante da sua utilização.

## 1.4 Qualidade bacteriológica da água

A água natural contém uma variedade imensa de microrganismos. A sua diversidade e quantidade são afetadas por bastantes fatores, tais como a precipitação, turvação, pH, concentração de metais, etc. Sendo impossível analisar todos os filos bacterianos, o teste da presença de bactérias coliformes é recomendado, uma vez que são um indicador de que outras bactérias de origem fecal podem estar presentes na água. No entanto o contrário já não é um fator indicativo, ou seja, a ausência de bactérias coliformes não garante a ausência de outras bactérias (WHO, 2008).

A presença de *E. coli* na água é um facto, principalmente nas águas residuais, que por sua vez contaminam as águas naturais; no entanto a sua concentração varia bastante. Todas as pessoas libertam *E. coli*, mas só pessoas infetadas libertam estirpes patogénicas deste organismo, pelo que a concentração destas varia ainda mais. Existe uma correlação positiva entre a concentração de estirpes não patogénicas e patogénicas de *E. coli* em água superficial, embora a concentração de estirpes patogénicas possa variar numa gama de valores muito mais alargada.

Mesmo a ausência de estirpes não patogénicas não invalida a ausência de patogénicas ou concentrações destas últimas abaixo da concentração de risco para a saúde pública.

A monitorização da qualidade bacteriológica da água pode ser efetuada com uma série de objetivos, incluindo:

- Validação (obtenção de evidências do desempenho das medidas de controlo);
- Monitorização operacional;
- Verificação;
- Vigilância;
- Dados para avaliação do risco microbiológico quantitativo.

No entanto, a qualidade bacteriológica da água não é só avaliada pela presença de bactérias coliformes e *E. coli*. Outros organismos podem ser pesquisados, validando outros aspetos do tratamento da água. Por exemplo, testes à presença de *Clostridium perfringens* validam a eficácia de desinfecção e remoção física de vírus e protozoários (WHO, 2011).

#### **1.4.1 Bactérias coliformes**

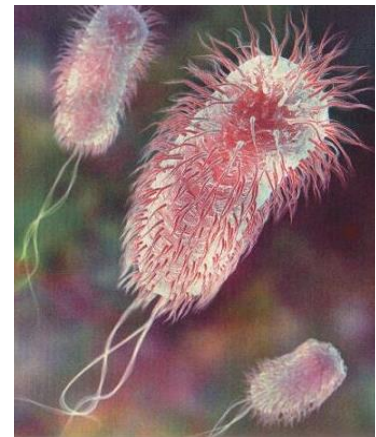
As bactérias coliformes são um grupo de microrganismos que habita o solo (coliformes ambientais) e o intestino do Homem e de outros animais de sangue quente (coliformes fecais). Uma vez que estas últimas sobrevivem no ambiente, podem ser disseminadas no mesmo através de contaminação fecal (e.g. solo, águas naturais e residuais domésticas). As bactérias coliformes totais incluem as espécies fecais e as ambientais (e.g. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Hafnia*). São definidas como bactérias em forma de bastonete, gram-negativas e não formadoras de esporos. Fermentam a lactose com produção de ácido e gás quando incubadas a 35-37°C. A *E. coli* e outros coliformes fecais (ou termotolerantes) constituem um subgrupo das bactérias coliformes totais capazes de crescer a 44-45°C.

Estas bactérias com capacidade de sobreviver e de se multiplicar na água, não sendo os melhores indicadores da presença de microrganismos patogénicos fecais, constituem contudo um bom indicador do estado de higienização e de integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes.

Imediatamente após a desinfecção devem estar ausentes, pelo que a sua presença indicia um tratamento inadequado (APDA, 2012a, APHA, 2005).

### *Escherichia coli*

A *E. coli* (Figura 5) é a bactéria mais representativa do grupo das bactérias coliformes fecais. Esta bactéria tem a característica de ser altamente específica das fezes do homem e animais de sangue quente. Como não se multiplicam em ambiente aquático são, utilizadas como indicadores específicos de poluição fecal. A *E. coli* está presente na flora intestinal humana onde, geralmente, não constitui problema para a saúde. No entanto, noutras partes do corpo, pode causar doenças como por exemplo, infecções urinárias. A temperatura da água e as concentrações de nutrientes não são, nas redes de distribuição, geralmente suficientes para favorecer a multiplicação da *E. coli* nos biofilmes, pelo que a sua presença fornece uma clara evidência de poluição fecal e dá indicação de que poderão estar presentes outros microrganismos igualmente de origem fecal, tais como bactérias, vírus e protozoários, estes sim prejudiciais à saúde (APDA, 2012b).



**Figura 5 - *Escherichia coli* O157:H7 (estirpe patogénica) ampliada por microscópio eletrónico. (Retirado de (COUNSEL, 2009))**

## 1.5 Resistência aos Antibióticos na Natureza

Um antibiótico num sentido amplo é um quimioterapêutico que inibe ou suprime o crescimento de microrganismos, tais como bactérias, fungos e protozoários.

Os antibióticos podem ser agrupados pela sua estrutura química ou mecanismo de ação. São um grupo de diversos produtos químicos que pode ser dividido em subgrupos diferentes, tais como beta-lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrólídeos, sulfonamidas e outros. Normalmente são moléculas complexas que podem possuir diferentes funcionalidades dentro da mesma molécula. Sob diferentes condições de pH, os antibióticos podem ser neutros, catiónicos, aniónicos, ou zwitteriônicos. Devido a estas características, diferentes funcionalidades dos antibióticos podem ser obtidas com diferente pH (KUMMERER, 2009a).

Atualmente a sua utilização é generalizada o que levou à disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos no meio ambiente. Devido a esta preocupação foram adotadas algumas medidas para tentar ultrapassar o problema, por exemplo, a Organização Mundial de Saúde considerou a categorização dos agentes antimicrobianos de acordo com a sua importância para a medicina humana como um ponto crítico na gestão estratégica do uso de antibióticos em animais utilizados para produção alimentar (AMAYA *et al.*, 2012).

O sucesso da utilização de antibióticos como agentes terapêuticos é devido à capacidade destas moléculas interferirem com as estruturas e/ou funções da célula bacteriana (procariótica), as quais estão ausentes nas células hospedeiras (eucariota). Por sua vez, os mecanismos de resistência estão relacionados com a capacidade que as bactérias têm para evitar esse tipo de

interferência (MANAIA *et al.*, 2011). A Tabela 1 resume alguns mecanismos de resistência usados por bactérias.

**Tabela 1 - Exemplos de mecanismos de ação e resistência encontrados em bactérias para diferentes agentes antimicrobianos. (Adaptado de (MANAIA *et al.*, 2011))**

Mecanismo de ação		Classes de agentes antibacterianos	Exemplo	Mecanismos de resistência
Interferência na síntese da parede celular		Lactâmicos	Penicilina Cefalosporina Carbapenêmico Monobactama	Hidrólise Efluxo Alteração-alvo
		Glicopeptídicos	Vancomicina Teicoplanina	Reprogramação da biosíntese do peptidoglicano
Inibição síntese Proteica - Ligação à subunidade ribossomal	50s	Macrolídeos	Eritromicina Azitromicina Espiramicina Cetromicina	Hidrólise Glicosilação Fosforilação Efluxo Alteração-alvo
	30s	Tetraciclina	Minociclina Oxitetraciclina Tetraciclina	Monooxigenação Efluxo Alteração-alvo
		Aminoglicosídeos	Estreptomicina Gentamicina Canamicina	Fosforilação Acetilação Nucleolização Efluxo Alteração-alvo
Inibição da síntese de ácido nucleico	ADN	Quinolonas	Ácido Nalidíxico Ciprofloxacina Moxifloxacina	Acetilação Efluxo Alteração-alvo
	ARN	Rifamicinas	Rifampicina	ADP-ribosilação Efluxo Alteração-alvo
Inibição da via metabólica		Sulfonamidas	Sulfanilamida Sulfametoxazol	Efluxo Alteração-alvo
Perturbação da membrana bacteriana		Polimixinas	Colistina	Efluxo Alteração-alvo

### 1.5.1 Mecanismos de resistência e disseminação

Estudos apresentam evidências da existência de estirpes ambientais não patogênicas com resistência a agentes antimicrobianos, mesmo antes de estes serem utilizados pela Medicina moderna. Estas moléculas de baixa massa molecular sempre estiveram presentes no meio ambiente, como produtos de metabolismo de alguns microrganismos e desempenhando funções importantes. A transferência de resistência e o seu mecanismo associado para patogênicos humanos/animais, terá ocorrido aquando da codificação de genes de resistência em elementos genéticos móveis (MARTINS, 2012).

#### 1.5.1.1 Resistência Natural ou Intrínseca (Via Vertical)

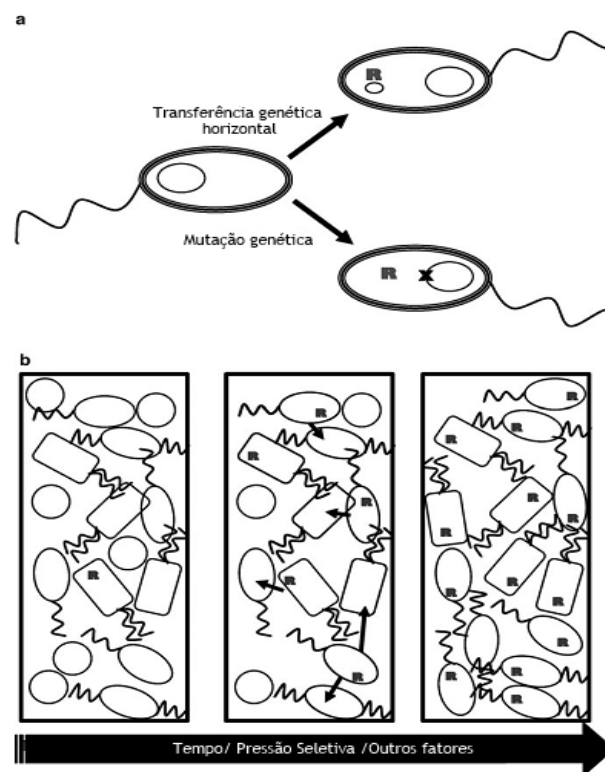
Devido às características intrínsecas aos microrganismos (fisiológicas e bioquímicas), estes podem não apresentar suscetibilidade a determinados compostos. Isto deve-se sobretudo à presença e produção desses compostos no seu ecossistema natural (KUMMERER, 2009b).

Sob condições favoráveis, os clones que albergam a mutação no gene podem ter vantagem, conseguindo maiores taxas de divisão celular do que as células não mutadas (maior aptidão, ou

seja, maior capacidade de um indivíduo para sobreviver e reproduzir-se) e, assim, tornarem-se dominantes. Em tal situação, o determinante genético da resistência é disseminado por transmissão vertical.

#### 1.5.1.2 Resistência Adquirida (Via Horizontal)

A resistência adquirida é observada apenas em alguns representantes da espécie, em que a maioria dos membros é suscetível ao agente antimicrobiano. Resistência adquirida aos antibióticos pode resultar de mutação genética ou recombinação genética (DAVIES and DAVIES, 2010). As mutações genéticas ocorrem aleatoriamente no genoma, muitas vezes, potenciadas por agentes mutagênicos. Em bactérias, a recombinação genética é frequentemente referida como a transferência de genes horizontal (Figura 6). Esse processo, também chamado de "sexo bacteriano", é muito comum entre bactérias e representa uma importante força motriz para a evolução bacteriana. Esta forma de recombinação genética envolve a transferência de material genético a partir de um dador para um recetor e requer que ambos partilhem o mesmo espaço, mas não necessariamente, a mesma espécie. Em geral, os processos de transferência de genes de forma horizontal são potenciados por elementos genéticos que facilitam a mobilização e integração de ADN exógeno, quer entre as células ou entre o ADN cromossômico, e elementos genéticos extracromossômicos e vice-versa. Exemplos destes elementos genéticos são plasmídeos, transposões e integrões, em que muitos dos genes de resistência a antibióticos conhecidos são inseridos no ADN. (MANAIA *et al.*, 2011).



**Figura 6** - Mecanismos de aquisição de resistência a antibióticos (a) e disseminação na comunidade ao longo do tempo (b). As setas indicam os processos de transferência horizontal de genes e R indica resistência adquirida. (Adaptado de (MANAIA *et al.*, 2011))

### 1.5.2 Ciprofloxacina

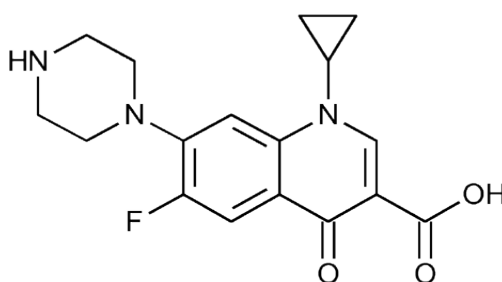
A ciprofloxacina é uma quinolona de 2ª geração, desenvolvida em 1987 pela Bayer AG.

As primeiras quinolonas foram utilizadas no início dos anos 60, com a introdução do ácido nalidíxico na prática clínica. No início dos anos 80, com o acréscimo de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico, surgiram as fluorquinolonas (RMCONTROLE, 2007).

A ciprofloxacina administrada tanto a humanos como a animais (SUKUL and SPITELLER, 2007). O seu espectro de atividade inclui a maioria das bactérias patogénicas responsáveis por infeções respiratórias, urinárias, gastrointestinais e abdominais, incluindo as Gram-negativas (*E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes* sensível à meticilina). A ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas são valorizadas por este amplo espetro de atividade, excelente penetração nos tecidos, e pela sua disponibilidade tanto em formulação oral como intravenosa (BRUNTON *et al.*, 2005)

O mecanismo de ação da ciprofloxacina consiste na inibição rápida da síntese de ADN, promovendo a clivagem do ADN bacteriano na ADN girase e na topoisomerase tipo IV, resultando assim numa morte bacteriana rápida. Regra geral, as bactérias Gram-negativas sofrem inibição do ADN girase e bactérias Gram-positivas sofrem inibição da topoisomerase tipo IV (OLIPHANT and GREEN, 2002).

A estrutura química apresentada abaixo representa a ciprofloxacina. Os seus grupos funcionais têm funções genéricas idênticas a todas as fluoroquinolonas, que em conjunto proporcionam as propriedades antibacterianas aos compostos (Figura 7).



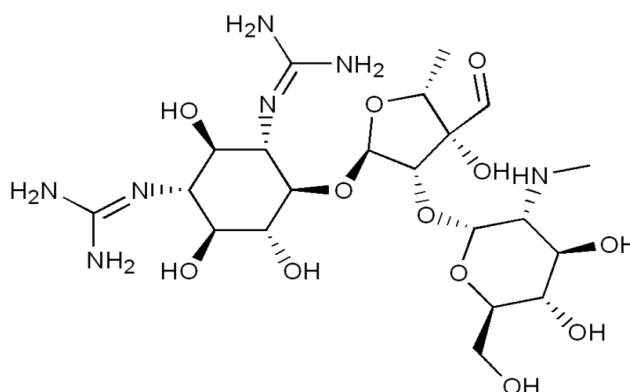
**Figura 7** - Estrutura química da ciprofloxacina. (Retirado de (BAX *et al.*)

### 1.5.3 Estreptomicina

A estreptomicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos (primeiro desta classe), descoberto por Albert Schatz em 1943 e produzido pela Merck & Co. Foi também o primeiro antibiótico capaz de combater a tuberculose, pelo que o seu uso foi bastante generalizado ao longo do tempo (COMROE, 1978). É considerado um antibiótico de largo espectro uma vez que atua tanto em bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (LUZZATTO *et al.*, 1968).

O mecanismo de ação da estreptomicina consiste na inibição da síntese proteica: liga-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo entre a ligação da N-formilmetionina com a subunidade 30s. Como consequência, ocorre a leitura errada do codão correspondente, a eventual inibição da síntese de proteína e finalmente, a morte microbiana através de mecanismos que ainda não são compreendidos (SHARMA *et al.*, 2007). A baixas concentrações, a estreptomicina apenas tem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano induzindo os ribossomas procariotas a uma falsa leitura do mRNA (ARN mensageiro) (VOET *et al.*, 2013).

A estrutura química da estreptomicina é representada abaixo (Figura 8).



**Figura 8** - Estrutura química da estreptomicina. (Retirado de (CHEMICALBOOK, 2010))

## 1.6 Organização da Tese

Na Introdução são descritos os principais temas de estudo deste trabalho. Em Materiais é Métodos são apresentados todos os métodos utilizados durante o estudo realizado no laboratório. Neste capítulo é apresentada também uma secção referente a Controlo de Qualidade efetuado em paralelo.

No capítulo Resultados e Discussão são apresentados os dados obtidos no estudo, assim como uma discussão sobre os mesmos.

O capítulo Conclusões engloba as conclusões que se podem obter do estudo, sugestões sobre possíveis melhorias do trabalho e novos projetos a desenvolver sobre o tema.



## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Colheita de amostras

A colheita das amostras de água natural superficial foi realizada no rio Douro, mais especificamente na albufeira de Crestuma-Lever, e decorreu durante os meses de Dezembro de 2013 e Janeiro de 2014. As amostras foram colhidas em dois recipientes de plástico estéril de 1 L e o transporte até ao laboratório foi efetuado em mala térmica refrigerada com termoacumuladores congelados (Figura 9). A análise foi realizada nas 4 h posteriores à colheita, mantendo-se as amostras refrigeradas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

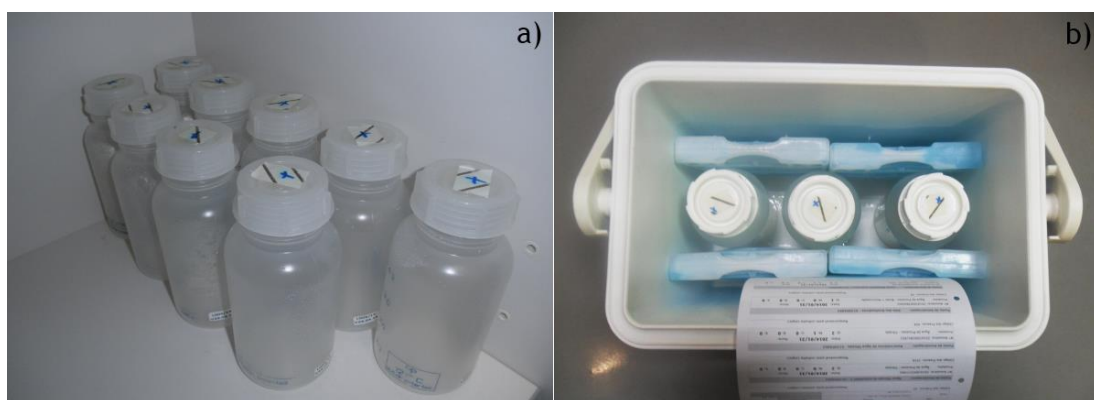


Figura 9 - a) Recipientes usados para a colheita de amostras; b) Mala de transporte das amostras.

### 2.2 Análise Microbiológica

A análise foi efetuada pelo método de filtração em membrana de acordo com o procedimento em vigor no laboratório o qual é baseado na norma ISO 9308-1:2000 (ISO, 2000).

#### 2.2.1 Meios de Cultura, Reagentes, Microrganismos e Antibióticos

##### Meios de Cultura

- Meio Lauril Sulfato Agar (LSA);
- Meio Triptona Soja Agar (TSA);
- Meio Fluorocult;

##### Reagentes

- Galeria Microgen™ GnA - MID64CE;
- Galeria Microgen™ GnB - MID65CE;
- MRD - *Maximum Recovery Diluent* - (Peptona Salina 0,1%);
- Óleo Mineral;
- Reagente Kovacs;
- Reagente Nitrato A;
- Reagente Nitrato B;

- Reagente Oxidase;
- Reagente TDA;
- Reagente VP I;
- Reagente VP II;
- Solução Salina 0,85%;

##### Antibióticos

- Ciprofloxacina;
- Estreptomicina;

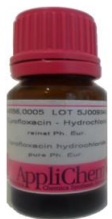

##### Microrganismos

- Lenticula *E. coli* NCTC 9001;
- Lenticula *Klebsiella oxytoca* NTCT 8167.

As características dos antibióticos testados são apresentadas na Tabela 2.

Os dois antibióticos foram adquiridos sob a forma de sal, pelo que foi necessário preparar soluções *stock*, as quais foram armazenadas a  $5\pm 3^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz. Antes de adicionadas ao meio, as soluções foram filtradas através de uma membrana com poros de  $0,22\ \mu\text{m}$ , de forma garantir a esterilidade do produto.

**Tabela 2 - Características dos antibióticos.** (Adaptado (APPLICHEM, O'NEIL, 2013, SIGMA-ALDRICH, 1997)).

Nome		
	<i>Ciprofloxacin Hydrochloride</i>	<i>Streptomycin Sulfate Salt</i>
Marca	AppliChem	Sigma
Lote	5J009344	086K1263
Fórmula Química	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$	$(\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{SO}_4$
Massa Molecular (g/mol)	387.84	1457.4
CAS - No	86393-32-0	3810-74-0
Temp. Armazenamento ( $^\circ\text{C}$ )	2-8	2-8
Solubilidade (g/L)	50	20

## 2.3 Equipamento e Materiais

- Agitador magnético com aquecimento;
- Autoclave  $121\pm 3^\circ\text{C}$ ;
- Balança Analítica;
- Balança de precisão;
- Banho de água  $45\pm 1^\circ\text{C}$ ;
- Bico de Bunsen;
- Bomba de vácuo;
- Câmara de Segurança Biológica;
- Copos de filtração estéreis graduados;
- Filtro estéril com poros de  $0,22\ \mu\text{m}$  acoplável a seringa;
- Frigorífico  $5\pm 3^\circ\text{C}$ ;
- Incubadora  $36\pm 2^\circ\text{C}$ ;
- Incubadora  $44,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ ;
- Hotte;
- Lâmpada UV,  $\lambda=366\ \text{nm}$ ;
- Material de laboratório de uso corrente;
- Medidor de pH;
- Membranas filtrantes estéreis, compostas por ésteres de celulose, com poro de diâmetro nominal de  $0,45\ \mu\text{m}$ , com grelha;
- Micro-ondas;
- Pipetas automáticas;
- Rampa de filtração;
- Reservatório para recolha de filtrados;
- Seringa estéril de 10 mL;
- Unidade purificadora de água;
- Vortex.

## 2.4 Preparação do meio seletivo

Para pesquisa e quantificação de bactérias coliformes e *E. coli* foi utilizado o meio Lauril Sulfato Agar (LSA) da marca *Oxoyd* com a referência CM0919. A preparação deste foi feita de acordo com as instruções do fabricante.

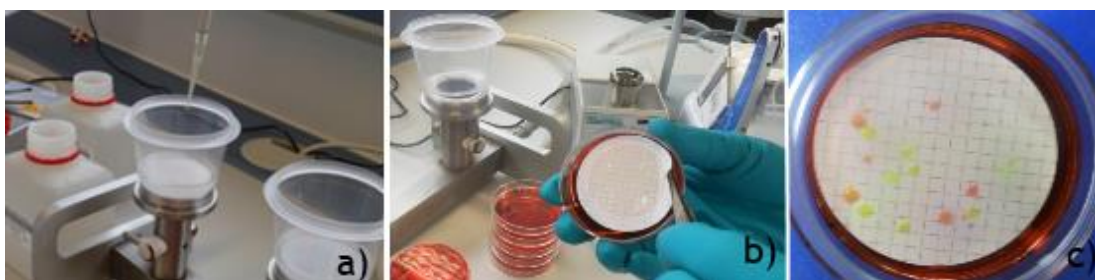
Após autoclavagem do meio a  $121\pm 3^\circ\text{C}$  durante 20 min, diferentes volumes de soluções *stock* de antibiótico (estéril por filtração em membrana com poros de  $0,22\ \mu\text{m}$ ) de acordo com a concentração final desejada, foram adicionados ao meio LSA previamente arrefecido num banho de água a uma temperatura de  $45^\circ\text{C}$  tendo sido posteriormente agitados para homogeneização. De seguida o meio foi vertido em placas de Petri estéreis de 50 mm. O meio preparado foi armazenado a  $5\pm 3^\circ\text{C}$  para posterior utilização (SULTANA, 2007).

## 2.5 Pesquisa e Quantificação - Método de filtração por membrana

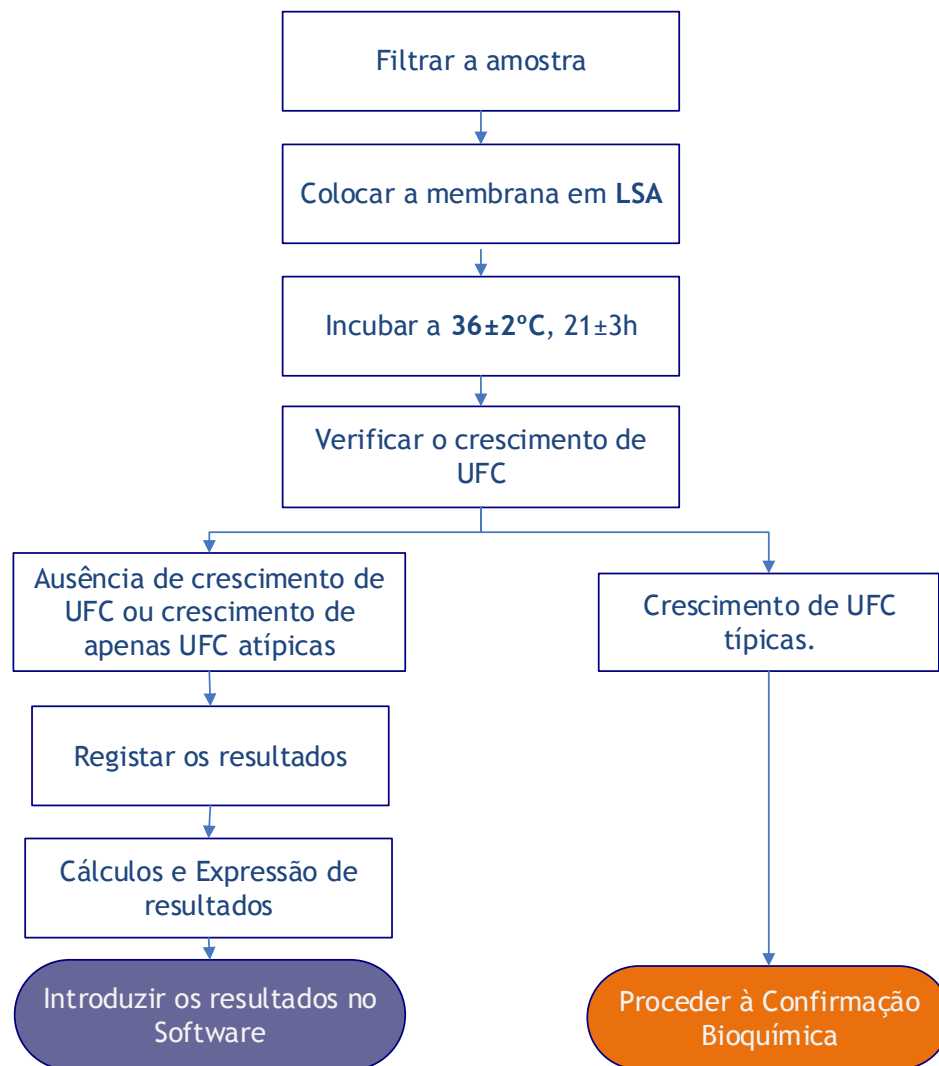
### 2.5.1 Sementeira e Incubação

O método foi baseado na filtração através de membrana, incubação no meio seletivo LSA e subsequente caracterização bioquímica das colónias típicas.

Volumes de amostra de 100 mL ou de diluições decimais destas foram filtrados através de uma membrana de nitrocelulose (Porosidade:  $0,45\ \mu\text{m}$ ; Diâmetro: 47 mm; Marca: Pall) capaz de reter as bactérias em estudo (Figura 10a). As membranas foram seguidamente colocadas em placas com o meio LSA previamente preparado e incubadas a  $36\pm 2^\circ\text{C}$  durante  $21\pm 3\text{h}$  (Figura 10b). Após este tempo foram contadas as colónias características, consideradas Lactose positivas (colónias fermentadoras de lactose produzem ácido apresentando coloração amarela) (Figura 10c e Figura 11).



**Figura 10** - a) Método de filtração; b) Pormenor da membrana na placa de LSA; c) Aspeto típico da placa após incubação.



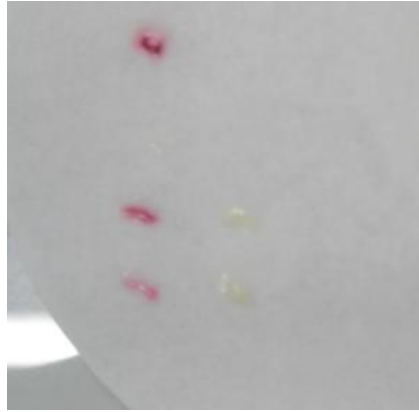
**Figura 11** - Método de sementeira de bactérias coliformes.

### 2.5.2 Confirmação Bioquímica

Foi efetuada uma subcultura das colónias características selecionadas ao acaso das placas que apresentavam as seguintes características:

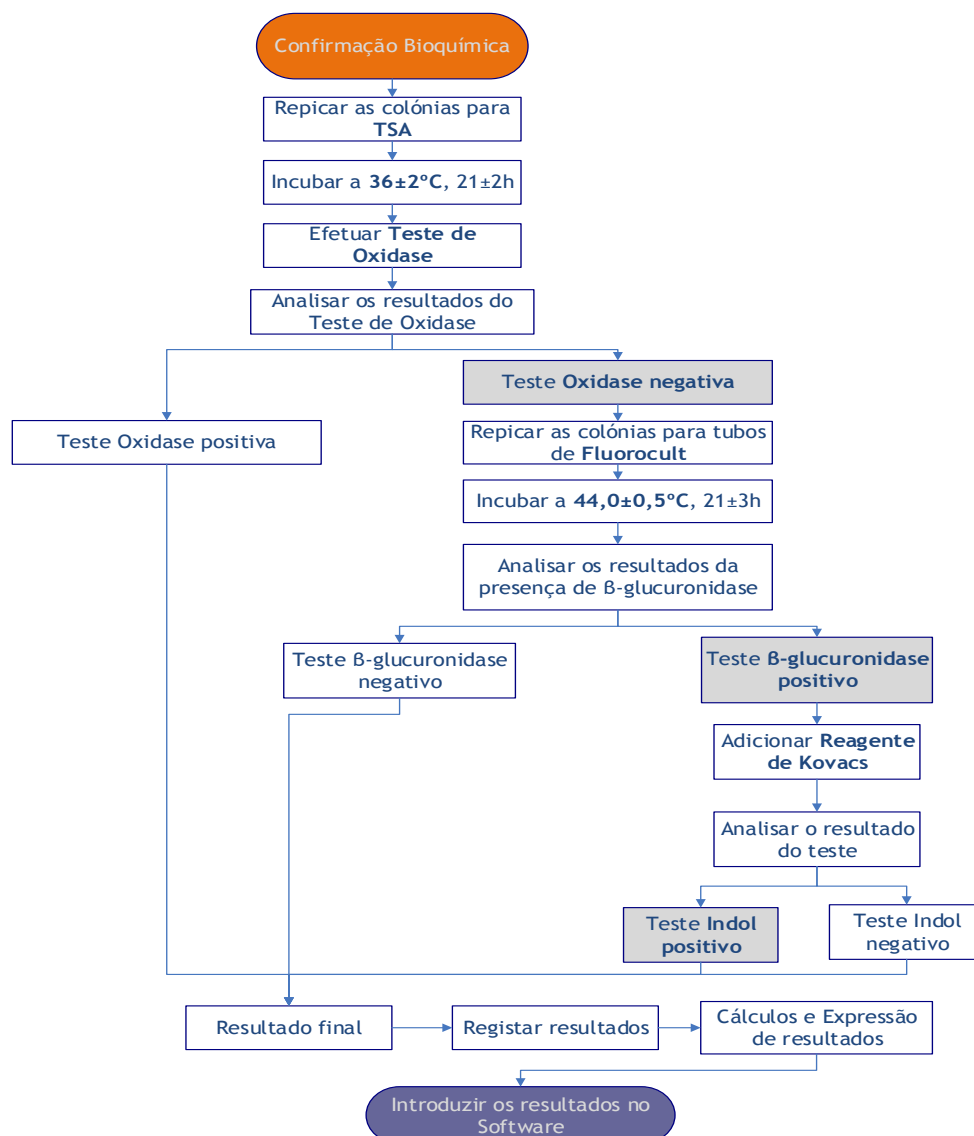
- Membranas com  $\leq 3$  colónias: Confirmadas todas as colónias;
- Membranas com  $> 3$  colónias: Confirmadas pelo menos 3 colónias.

A subcultura foi realizada em meio TSA com incubação durante  $21\pm 3$ h a  $36\pm 2^\circ\text{C}$ . Após este período foi realizado o teste de Oxidase, o qual consiste em molhar papel de filtro em reagente Oxidase (Merck®), recolher uma porção da subcultura com uma ansa descartável e plástico estéril e esfregar a ansa no papel de filtro. No caso de o teste ser positivo, a cultura esfregada no papel de filtro muda a sua coloração para rosa devido à presença da enzima Citocromo Oxidase, no caso de ser negativo, continua com a sua cor característica (Figura 12).



**Figura 12** - Aspeto de um papel de filtro apresentando colónias com resultado positivo e negativo.

A confirmação da presença de bactérias coliformes e *E. coli* foi efetuada de acordo com o esquema da Figura 13. As subculturas consideradas Oxidase negativas neste ponto foram inoculadas em meio *Fluorocult* e incubadas a  $44,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $21 \pm 3\text{h}$  (Figura 14).



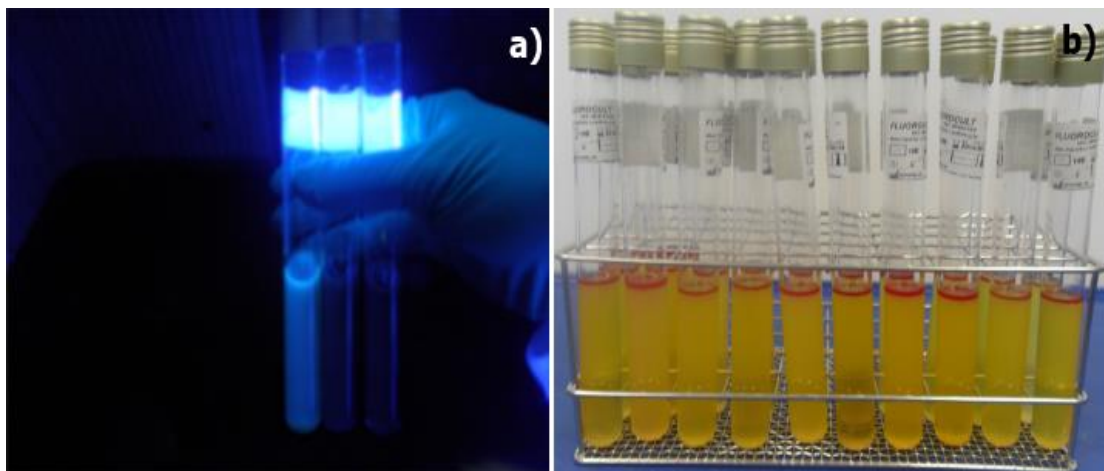
**Figura 13** - Confirmação de bactérias coliformes e *E. coli*.



**Figura 14** - Tubo de Fluorocult a ser inoculado.

O teste de presença de  $\beta$ -glucuronidase é aferido através da presença de fluorescência sob luz UV a  $\lambda=366$  nm (Figura 15a). No caso de ser positivo confirmou-se a presença da enzima  $\beta$ -glucuronidase e as amostras seguiram para o teste de Indol.

O teste de Indol consistiu na adição de uma pequena quantidade (0,2 a 0,3 mL) de reagente de Kovacs às culturas previamente selecionadas para verificar se existe formação de Indol a partir do Triptofano (aparecimento de coloração carmim na superfície do meio) (Figura 15b). As bactérias coliformes  $\beta$ -glucuronidase e Indol positivas foram consideradas *E. coli*.



**Figura 15** - a) Teste de Fluorescência; b) Tubos de Fluorocult com reação carmim.

Neste estudo foram consideradas bactérias totais todas as que apresentam a capacidade de crescer em meio LSA, bactérias coliformes aquelas com capacidade de fermentar a lactose e que não possuíam a enzima citocromo oxidase e *E. coli* as bactérias capazes de produzir Indol a partir do triptofano e que possuíam a enzima  $\beta$ -glucuronidase.

Após confirmação foram efetuados os cálculos.

### 2.5.3 Enumeração

#### Seleção das placas onde efetuar as confirmações

De modo a proceder à confirmação bioquímica foram selecionadas as placas que respeitavam os seguintes requisitos:

- Número total de colónias  $\leq$  a 100;
- Colónias típicas perfeitamente isoladas.

#### Contagem

A contagem foi efetuada ao longo das linhas definidas pela grelha da membrana. Assumindo-se que cada colónia teve origem num único microrganismo ou agregado de microrganismos, o resultado final foi expresso em Unidades Formadoras de Colónias (UFC) em 100 mL de amostra.

Para confirmação, foi calculada para cada uma das placas selecionadas o resultado confirmado como uma proporção das colónias que obedeceram aos critérios de identificação ou confirmação, de acordo com a seguinte equação:

$$x = \frac{k}{n} \times z \quad (3.1)$$

$x$  - Nº total de colónias confirmadas por placa;

$k$  - Nº de colónias confirmadas;

$n$  - Nº de colónias presumíveis a confirmar;

$z$  - Nº total de colónias presumíveis.

Seguidamente calculou-se o número estimado de UFC em 100 mL fazendo uma proporção em relação ao volume analisado.

Nos cálculos intermédios para expressão de resultados não foram efetuados arredondamentos. No valor final foram efetuados arredondamentos de acordo com os critérios do *Microsoft Excel*®.

## 2.6 Identificação Bioquímica - Sistema Comercial

Após realização dos testes de confirmação bioquímica descritos anteriormente foram selecionadas algumas colónias de bactérias resistentes aos antibióticos para confirmação bioquímica com sistema comercial Microgen™-ID.

O sistema Microgen™-ID é composto por duas galerias GnA e GnB. Destinado à identificação de enterobactérias e um extenso grupo de bacilos Gram negativos e Oxidase positivos, estes podem ser identificados utilizando uma combinação das galerias GnA + GnB, ou seja, 24 substratos. A galeria GnA é destinada à identificação de bactérias Oxidase negativas, Nitrato positivas e fermentadoras de Glucose. As galerias GnA e GnB, utilizadas em conjunto, são destinadas à identificação de bacilos não fastidiosos, Gram negativos (Oxidase negativa e positiva). A galeria GnB é destinada à utilização conjunta com a galeria GnA e nunca sozinha.



A partir de culturas puras das bactérias em estudo, selecionou-se uma colónia bem isolada para ser identificada. Emulsionou-se a colónia em 5 ml de uma solução salina estéril (NaCl a0,85%, v/v) para inocular a galeria **Gn A+ GN B**. Agitou-se vigorosamente. Cuidadosamente retirou-se a película adesiva que sela a galeria e procedeu-se à inoculação das galerias. Utilizou-se uma Micropipeta para 100 µL para adicionar a suspensão a cada poço das galerias (Figura 16).



**Figura 16** - Inoculação de uma galeria.

Para a galeria **Gn A** encheram-se com 3-4 gotas de óleo mineral os poços 1, 2, 3 e 9. Selou-se a galeria com a película adesiva anteriormente retirada tendo o cuidado de deixar as perfurações da película sobre os poços.

Para a galeria **Gn B** encheram-se com 3-4 gotas de óleo mineral os poços 20 e 24. Selou-se a galeria com a película adesiva anteriormente retirado tendo o cuidado de deixar as perfurações da película sobre os poços.

As galerias foram colocadas a incubar a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante  $21\pm 3\text{h}$ .

Foram lidos e registados os resultados das galerias de acordo com as tabelas fornecidas pelo fabricante nos módulos fornecidos pelo fabricante, completando o código octal (Figura 17). As tabelas de comparação assim como os testes das galerias podem ser consultadas no anexo E.1.

Analizou-se o resultado com o auxílio do *software* “Microgen™ Identification System Software” de acordo com as instruções do fabricante.

Paralelamente ao estudo, foram realizados testes de pureza e controlo de qualidade para garantir a validade dos resultados (MICROGEN, 2011).

**GN-ID A+B PANEL  
REPORT FORM**

Lab. No. \_\_\_\_\_ Specimen Type: *C(3)*  
Date: \_\_\_\_\_

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Melinite	Inositol	Sorbitol	Phenol	Sucrose	Lactose	Arabinose	Alonitol	Raffinose	Salicin	Annine
Result	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	4 6 5 0												0 3 4 0														

Octal Code: *46500340* Final Identification: *E. coli - imc hve (93,41 X)*

WFI125/06/03

**Figura 17** - Exemplo de Modelo Microgen™ para registo dos resultados.



## 2.7 Taxa de Prevalência

A taxa de prevalência de bactérias relativa a uma concentração específica de antibiótico para cada amostra foi calculada da seguinte forma:

$$TP_i = \left(1 - \frac{N_{LSA,i} - N_{Ax,i}}{N_{LSA,i}}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

$TP_i$  - Taxa de prevalência para amostra do dia  $i$ ;

$N_{LSA,i}$  - UFC/100 mL para a amostra sem antibiótico do dia  $i$ ;

$N_{Ax,i}$  - UFC/100 mL para a amostra com antibiótico  $x$  do dia  $i$ .

## 2.8 Controlo de Qualidade

### Utilização Material de Referência Certificado

Retirou-se o tubo que contém a lentícula do congelador. Certificou-se que a sílica apresenta cor amarelada. Manteve-se à temperatura ambiente durante 5 a 10 min. Abriu-se cuidadosamente o tubo, garantido que a lentícula não ficou retida na tampa. Transferiu-se a lentícula com uma pinça estéril para um tubo com rolha, contendo aproximadamente 9 mL de MRD à temperatura ambiente. Assegurou-se que a lentícula foi transferida para o diluente. Manteve-se 10 min à temperatura ambiente para reidratar. Antes de prosseguir foi certificado de que a lentícula estava completamente solubilizada. Apertou-se bem a rolha e agitou-se cerca de 30 vezes durante 15 s. Deixou-se repousar cerca de 5 min de forma a permitir que as pequenas bolhas que se possam ter formado dispersassem.

Com o auxílio de uma pipeta transferiu-se todo o conteúdo para outro frasco contendo 100 mL de água estéril. Lavou-se uma vez o primeiro recipiente com 2 mL do conteúdo do segundo e agitou-se cerca de 50 vezes para obter uma amostra homogeneizada de água. O mais rapidamente possível, analisou-se a amostra como qualquer outra, seguindo o método normal. Após realizada a análise, registaram-se os valores obtidos.

### 2.8.1 Controlo Qualitativo

Para o controlo qualitativo, foram utilizados Materiais de Referência (MR).

Este controlo consistiu em submeter amostras de controlo de qualidade, ao usual isolamento, identificação e procedimentos de confirmação, normalmente utilizados nas amostras reais.

As amostras de controlo de qualidade continham organismos alvo e organismos não-alvo. Se as metodologias funcionassem satisfatoriamente, estes microrganismos seriam detetados, ou não, respetivamente.

### Controlo da Confirmação da presença de *E. coli*

As amostras para **controlo positivo**, continham organismos alvo (*Escherichia coli*), que produzem colónias típicas ou reações características nos meios de isolamento e testes de confirmação.

As amostras para **controlo negativo**, continham organismos não-alvo (*Klebsiella oxytoca*), que originam colónias atípicas, produzindo reações não características em meios de isolamento e testes de confirmação.

Semanalmente foi efetuado um controlo positivo e negativo, sendo as amostras de controlo positivo, confirmadas tal como todas as outras amostras.

### **2.8.2 Controlo Quantitativo**

Para o controlo quantitativo foi utilizado um Material de Referência Certificado (MRC), o valor obtido foi registado na Carta Guia utilizada em rotina pelo laboratório para o método destinado à quantificação de bactérias coliformes e *E. coli* por filtração em membrana.

#### Carta Guia

Para o cálculo dos Limites de Controlo da Carta Guia (Ação e Aviso), foram utilizados 20 valores obtidos nas análises dos Materiais de Referência. Estes valores foram obtidos no laboratório anteriormente à realização deste trabalho prático.

Os valores fora dos Limites de Ação foram considerados aberrantes, sendo excluídos, substituídos por outro valor e recalculados os limites.

Para o cálculo dos limites de controlo, os valores obtidos nas análises foram logaritmizados ( $\log_{10}$ ), posteriormente calculou-se a média e o desvio padrão destes.

Estes cálculos têm por base as seguintes fórmulas:

$$\sum R_{log} = 0,0981 + 0,0483 + \dots + 0,0669 + 0,0414 = 0,71889 \quad (3.3)$$

$$\bar{R} = \sum \frac{R_{log}}{n} = \frac{0,71889}{15} = 0,0479 \quad (3.4)$$

Em que:  $n$  = n.º de lenticulas analisadas;

O cálculo do desvio padrão foi feito com base nas médias móveis (Equação 3.5), uma vez que este método de cálculo do desvio padrão é menos influenciado por “valores extremos ou aberrantes”, frequentemente encontrados nas determinações de parâmetros microbiológicos.

$$\text{Desvio Padrão:} \quad S = 0,8865 \times \bar{R} \quad (3.5)$$

Os limites de controlo foram calculados do seguinte modo:

$$\text{Limites de Aviso:} \quad \bar{X} = \pm 2S \quad (3.6)$$

$$\text{Limites de Ação:} \quad \bar{X} = \pm 3S \quad (3.7)$$

A Carta Guia foi construída fazendo o anti-log dos valores  $\bar{X}$ ,  $\bar{X} = \pm 2S$  e  $\bar{X} = \pm 3$  marcando os Limites de Aviso e de Ação.

Foi analisado semanalmente um MRC e o resultado inserido na Carta Guia.

A Aceitação/Rejeição foi feita de acordo com os limites de controlo calculados.

O resultado foi considerado fora de controlo quando:

- Uma única violação dos Limites de Ação ( $\bar{X} = \pm 3S$ );
- Duas observações consecutivas que excedam os Limites de Aviso ( $\bar{X} = \pm 2S$ );
- Nove ou mais observações consecutivas do mesmo lado da média ( $\bar{X}$ );
- Seis ou mais observações alinhadas em sentido ascendente ou descendente.

### 2.8.3 Duplicados de Análises

Em algumas das amostras foram efetuadas análises em duplicado. A validação dos resultados foi efetuada de acordo com os critérios de precisão em vigor no laboratório para a determinação de bactérias coliformes e *E. coli* pelo método de filtração em membrana. Este critério foi calculado a partir da amplitude dos logaritmos dos duplicados ( $R_{\log i}$ ) e da média dessas amplitudes ( $\bar{R}$ ) (3.4).

Com base nestes cálculos foi determinado o Limite Superior de Reprodutibilidade ( $LS_R$ ) e o Limite Inferior de Reprodutibilidade ( $LI_R$ ) para duplicados de amostras.

$$LS_R = \bar{R} \times D1 \quad (3.8)$$

$$LI_R = \bar{R} \times D2 \quad (3.9)$$

$D1 = 0,00$  e  $D2 = 3,27$

### 2.8.4 Testes de Esterilidade

Diariamente efetuou-se um branco de esterilidade. Para tal, verificou-se em conjunto a esterilidade dos meios de cultura, membranas filtrantes, solução de diluição, água de arrefecimento da rampa de filtração, pontas de micropipetas, placas e copos de filtração, utilizando a solução de diluição ou água estéril como amostra.

Todos os suprimentos utilizados, adquiridos já preparados ou preparados internamente foram submetidos a controlo de qualidade para a sua esterilidade, tendo sido efetuado teste de lote (por amostragem foi avaliado um representante de cada lote utilizado). Foi também realizado um teste de esterilidade durante as confirmações, verificando a esterilidade das ansas estéreis disponíveis, passando uma ansa em meio TSA o qual foi posteriormente incubado a  $36 \pm 2$  °C durante  $21 \pm 2$ h.



## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Análises Efetuadas

A amostragem foi efetuada entre 12 de dezembro de 2013 e 31 de janeiro de 2014.

Neste período foram colhidas 26 amostras de água do rio Douro, as quais foram analisadas para a presença de bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* utilizando meio LSA. Em paralelo as mesmas amostras foram analisadas em meio LSA suplementado com ciprofloxacina (CIP) e estreptomicina (STR) com diferentes concentrações.

Nas análises realizadas foram encontradas um total de 7812 colónias, das quais 5420 (69,4% do total) apresentavam aspeto típico de bactérias coliformes e 2392 aspeto atípico. Das 5420 que apresentavam um aspeto típico de bactérias coliformes foram selecionadas 501 (6,4% do total) para testar a produção de ácido e a presença de enzima Citocromo Oxidase tendo sido confirmadas como bactérias coliformes um total de 426 (5,5% do total). Nestas foram efetuados testes para a presença da enzima de  $\beta$ -glucuronidase e para a produção de Indol a partir do triptofano, sendo confirmadas um total de 262 *E. coli* (3,6% do total).

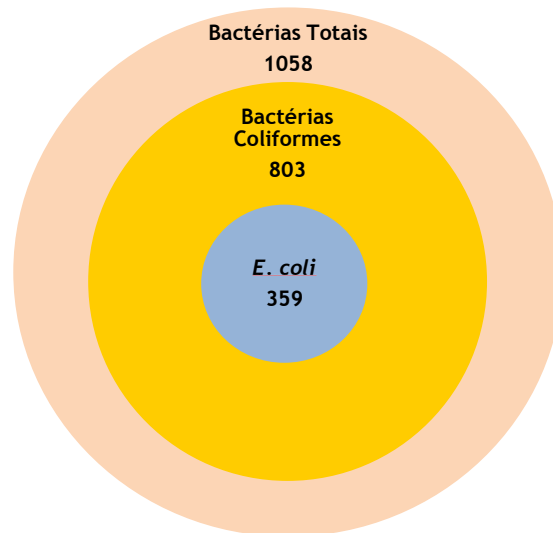
A Tabela 3 resume os dados apresentados acima. Para os dados detalhados de cada amostra consultar Tabelas do Anexo A.

*Tabela 3 - Resumo dos dados de contagem absoluta.*

Nº	LSA	LSA + CIP	LSA + STR	TOTAL
Número colheitas	26			
Total colónias típicas	1185	1412	2823	5420
Total colónias atípicas	467	353	1572	2392
Coliformes típicas confirmadas	86	203	212	501
Bactérias coliformes	82	187	157	426
<i>E. coli</i>	45	149	68	262
Alíquotas analisadas	62	246	267	575
Alíquotas confirmadas	31	83	88	202

### 3.2 Caracterização da população

Durante o período em que decorreu o estudo, as amostras provenientes do Rio Douro apresentaram um total 1058 bactérias totais, desta população 803 eram bactérias coliformes e destas 359 foram confirmadas como *E. coli* (Gráfico 1).



**Gráfico 1 - Bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* no Rio Douro.**

#### Dados relativos à turvação da água

Os dados de turvação da água na zona da albufeira de Crestuma-Lever foram obtidos junto da empresa Águas do Douro e Paiva.

#### Dados meteorológicos

Junto do Instituto de Meteorologia, foram obtidos os dados diários de precipitação da zona, registados pelo radar meteorológico de Arouca situado na Serra da Freita (Anexo B).

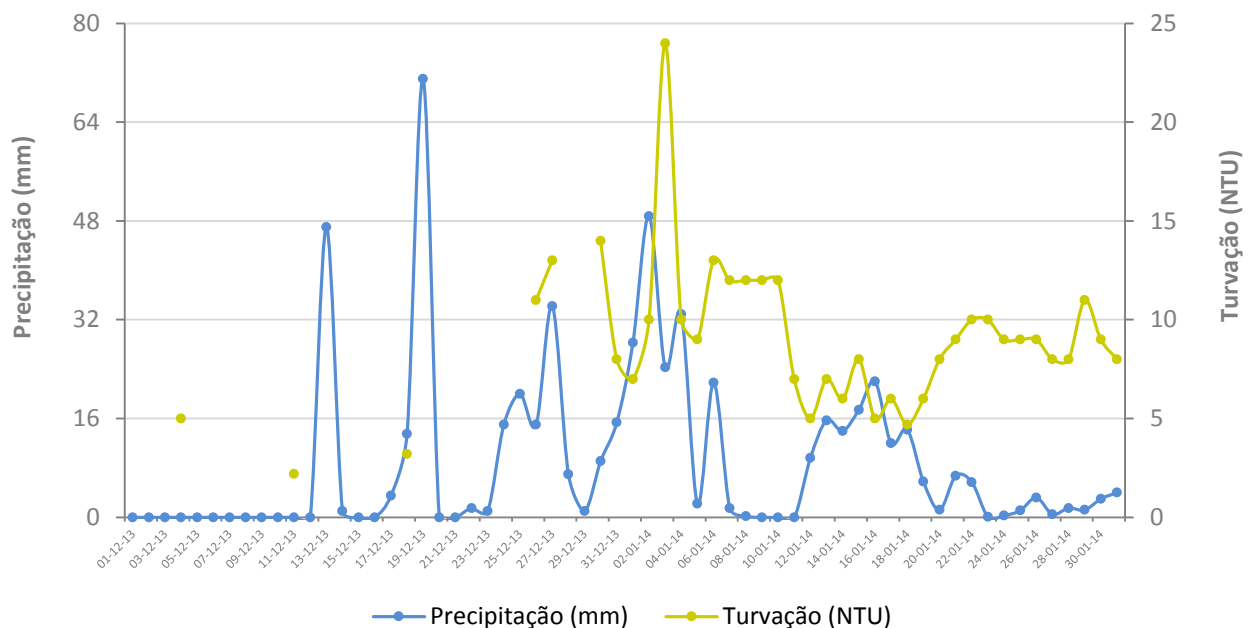
Os dados de turvação e de precipitação foram comparados com os valores de bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* obtidos na água da albufeira de Crestuma-Lever.

Entre os dias 1 de dezembro de 2013 e 31 de janeiro de 2014 foram observados valores de precipitação entre 0 e 71 mm e de turvação entre 3,2 e 13 NTU (Unidades Nefelométricas de Turvação).

A variação da turvação na albufeira provavelmente deve-se não só à precipitação como também ao regime de funcionamento da barragem de Crestuma-Lever, dependendo do local por onde estão a ser efetuadas as descargas. Descargas apenas de superfície fazem com que a água que corre mais à superfície passe por cima da barragem, mas a água que corre no fundo bata na parede da barragem fazendo levantar sedimentos depositados no leito da albufeira. Descargas apenas de fundo ou nos dois regimes de funcionamento não afetam tanto os valores de turvação no local de colheita.

Por outro lado o caudal do rio, e consequentemente o arraste de sedimentos e nível de turvação, está dependente das barragens a montante, tanto do Rio Douro como dos seus afluentes.

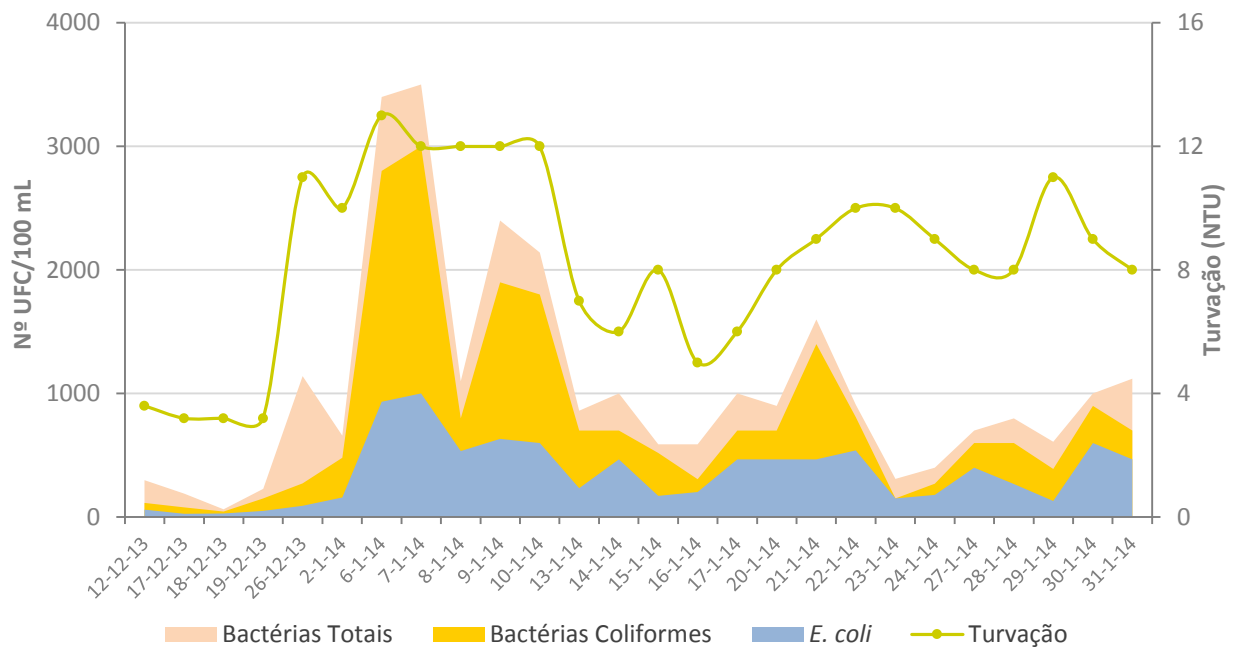
O Gráfico 2 mostra a relação entre a precipitação e a turvação nos meses de dezembro e janeiro. Estes fatores foram relevantes no decorrer do presente estudo uma vez que têm influência na população microbiana do rio e sofreram grandes variações ao longo destes meses. Pela análise do gráfico podemos concluir que quando ocorriam valores elevados de precipitação, nos dias posteriores a água do rio apresentava aumento dos valores de turvação. **Nota:** Durante a maioria do mês de dezembro os valores de turvação da água do rio têm uma frequência semanal. A partir de 30 de dezembro os valores de turvação passaram a ser diários.



**Gráfico 2** - Precipitação e Turvação da água na albufeira nos meses em que decorreu o estudo.

No Gráfico 3, observa-se a variação das bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* com a turvação ao longo dos dias do estudo. Os valores observados nas diferentes análises realizadas ao longo do estudo variaram bastante: para bactérias totais variaram entre os 62 UFC e os 3500 UFC; para bactérias coliformes os valores de UFC variaram entre 42 e 3000 UFC e para *E. coli* os valores de UFC variaram entre 27 UFC e 1000 UFC.

Muitas das bactérias encontram-se agregadas a partículas de sedimentos (solo, vegetação, matéria fecal, etc.) o que potencia a existência de um maior número de bactérias aquando de uma maior turvação da água e justifica valores tão díspares entre as amostras, num período de tempo tão pequeno.



**Gráfico 3** - Número de UFC/100 mL para bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* vs. turvação da água natural.

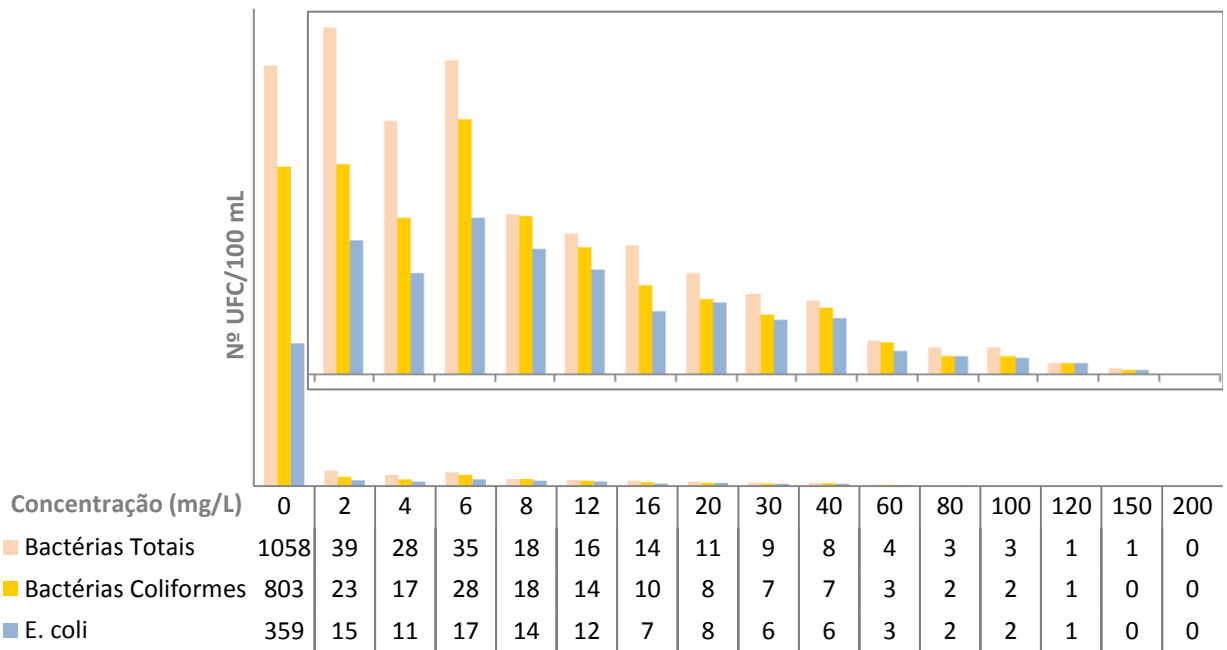
### 3.3 Bactérias resistentes a Ciprofloxacina

Para a ciprofloxacina foram testadas concentrações de 2 mg/L a 200 mg/L.

O Gráfico 4 apresenta a média (arredondada à unidade) do número de bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* em UFC por 100 mL para as diferentes concentrações de ciprofloxacina. Para valores de concentrações de 2 mg/L a 6 mg/L observa-se uma prevalência elevada (entre 20,9% e 9% para *E. coli*). Para concentrações intermédias (8 mg/L a 40 mg/L) observa-se uma prevalência entre 3,6% e 1,9%. Para concentrações acima de 60 mg/L a redução de bactérias é quase total (taxas de prevalência de *E. coli* inferiores a 1%) no entanto é preciso concentrações superiores a 150 mg/L de ciprofloxacina para eliminar completamente as bactérias coliformes e *E. coli*, o que sugere uma grande resistência por parte de algumas destas bactérias à ciprofloxacina. Com dosagens de 200 mg/L não ocorreu nenhum crescimento, pelo que é possível observar que esta concentração de antibiótico é suficientemente elevada para anular qualquer tipo de crescimento bacteriano. A resistência existente não está disseminada na maioria das bactérias (uma vez que é possível eliminar a grande maioria das bactérias com uma concentração de antibiótico baixa), mas aquelas que sobrevivem apresentam uma elevada resistência à ciprofloxacina. A partir da dosagem de 60 mg/L já existem amostras sem crescimento e as outras apresentam crescimentos de bactérias muito baixos (1-6 colónias totais).

As taxas de prevalência média de bactérias para as diferentes concentrações de ciprofloxacina encontram-se na Tabela 4.





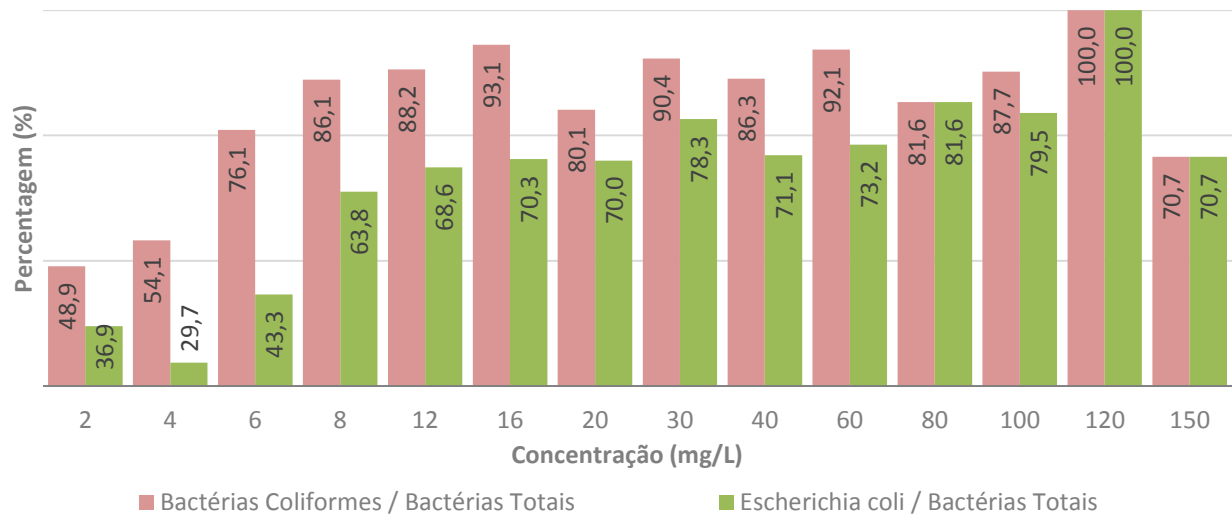
**Gráfico 4** - Média de UFC/100 mL para diferentes concentrações de ciprofloxacina. (Na caixa foram apresentados os mesmos valores, mas ampliados.)

**Tabela 4** - Taxas de prevalência média das bactérias para ciprofloxacina.

	Concentração (mg/L)														
	2	4	6	8	12	16	20	30	40	60	80	100	120	150	200
Bactérias Totais	11,3	5,8	4,6	2,0	1,5	1,9	1,5	1,4	1,1	0,5	0,5	0,4	0,2	0,1	0,0
Bactérias Coliformes	12,6	8,6	4,6	2,1	2,0	1,8	1,2	2,0	1,4	0,7	0,8	0,5	0,3	0,1	0,0
<i>E. coli</i>	20,9	15,0	9,0	3,6	3,8	2,9	1,6	3,2	1,9	0,9	0,9	0,7	0,5	0,2	0,0

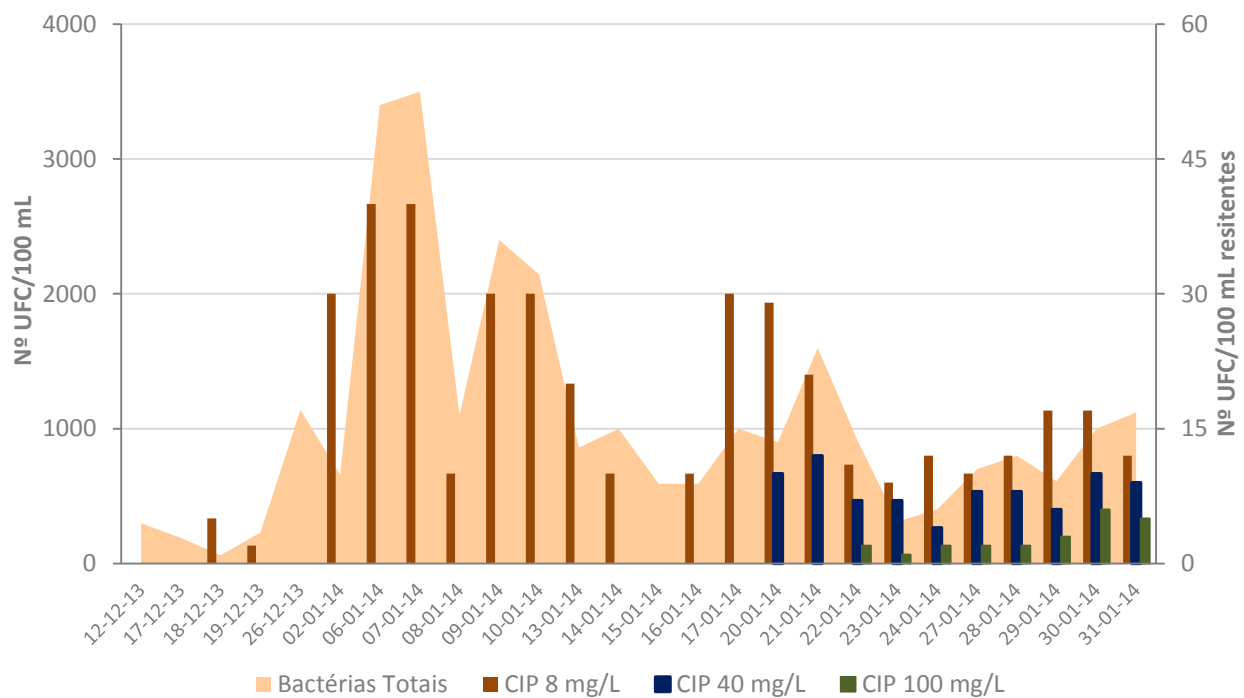
Analisando também o Gráfico 5 é possível concluir que para baixas concentrações (entre 2 mg/L e 12 mg/L) predominam bactérias coliformes, enquanto para concentrações elevadas (entre 16 a 150 mg/L) predominam as *E. coli*, o que sugere uma maior resistência à ciprofloxacina por parte das *E. coli* relativamente às outras bactérias coliformes.

O registo dos valores de obtidos, bem como todos os valores utilizados para as taxas de prevalência e diversidade microbiana podem ser consultados no Anexo C.1.

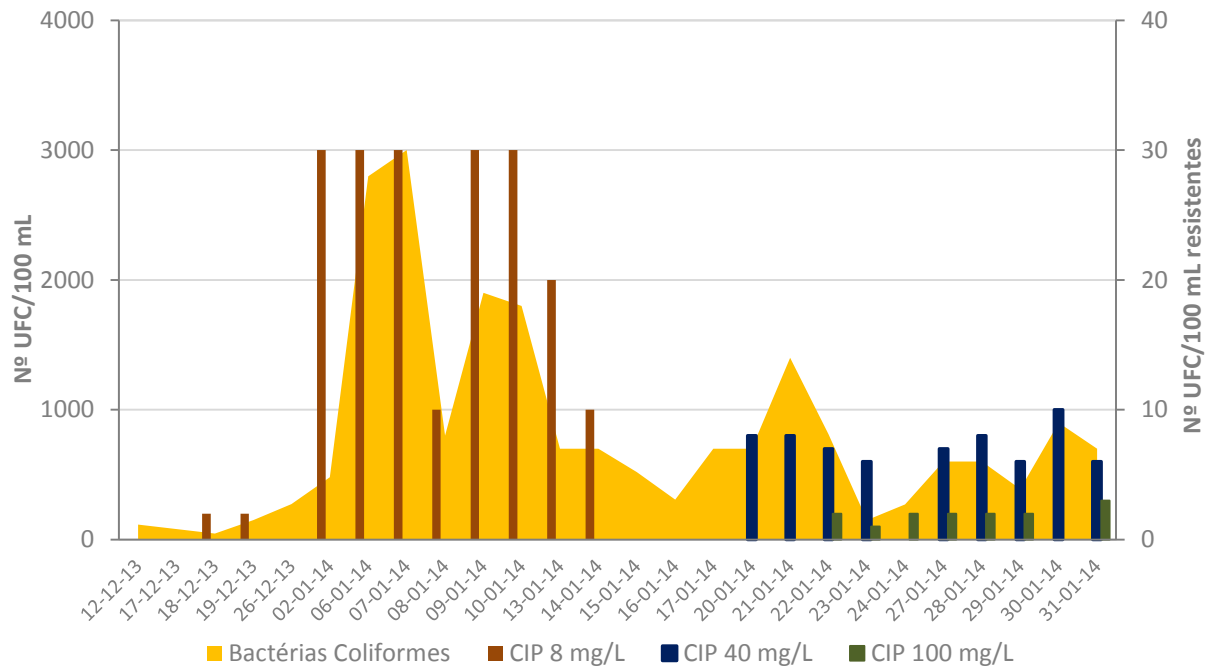


**Gráfico 5** - Proporção de bactérias coliformes e *E. coli* relativamente às bactérias totais no estudo com ciprofloxacina.

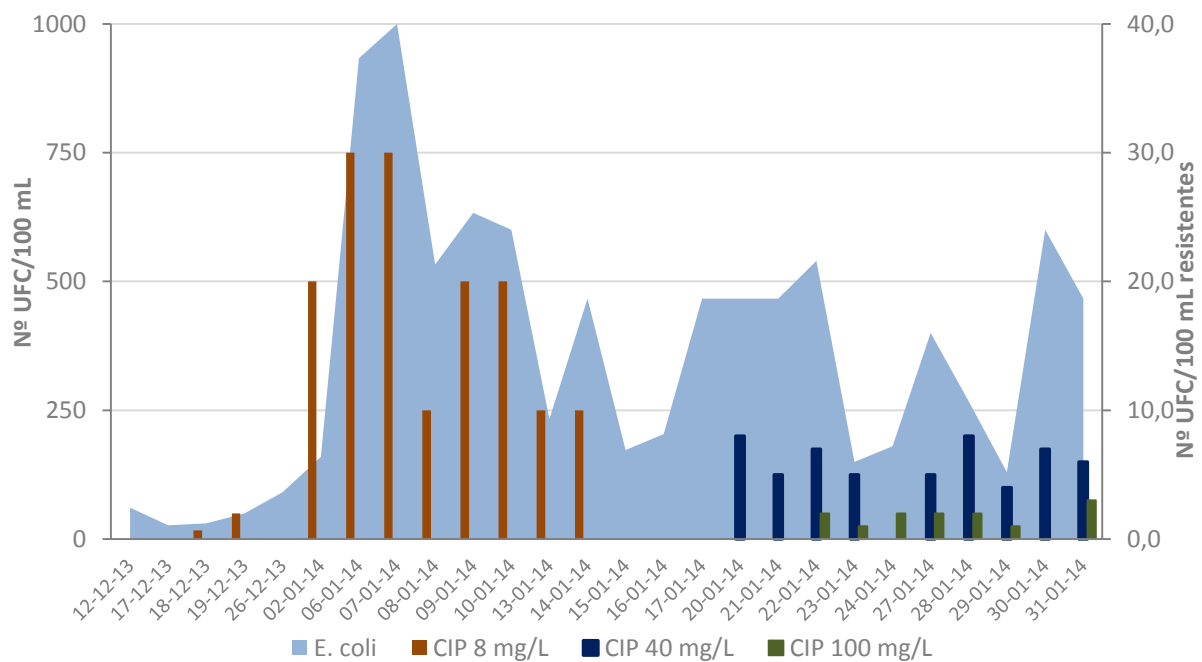
Nos Gráficos 6, 7 e 8 é possível observar uma proporcionalidade entre as bactérias totais resistentes a diferentes concentrações de ciprofloxacina, bactérias coliformes resistentes e *E. coli* resistentes e o número total de bactérias respetivas nas amostras sem antibiótico. A proporcionalidade, observada a diferentes concentrações e para os diferentes tipos de bactérias em análise confirma que a população de *E. coli*, bactérias coliformes e bactérias totais resistentes acompanha a variação da população na água natural.



**Gráfico 6** - Comparação entre o número de bactérias totais e o número de bactérias totais resistentes a ciprofloxacina.



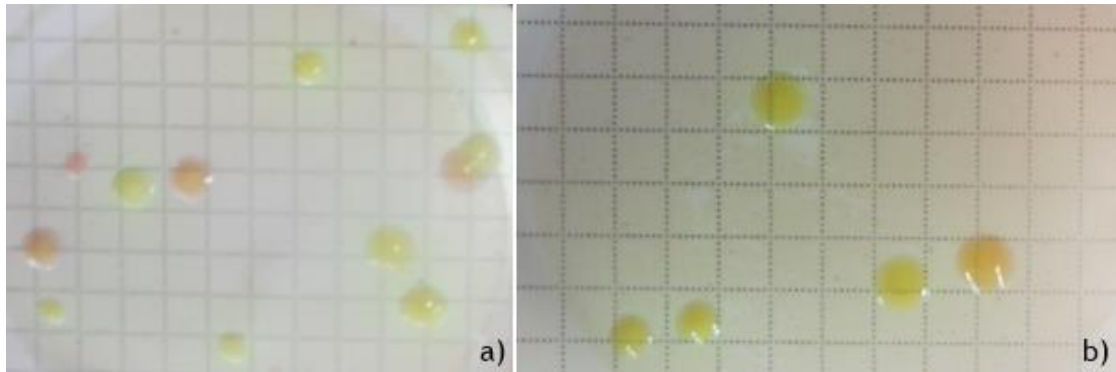
**Gráfico 7** - Comparação entre o número de bactérias coliformes e o número de bactérias coliformes resistentes a ciprofloxacina.



**Gráfico 8** - Comparação entre o número de *E. coli* e o número de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina.

O aspeto das colónias de bactérias que cresceram a baixas concentrações e a altas concentrações de ciprofloxacina foi diferente. Enquanto a baixas concentrações, as bactérias presentes nas placas com meio suplementado com ciprofloxacina tinham um aspeto idêntico àsquelas que cresciam em meio LSA sem antibiótico, a altas concentrações de antibiótico, para além de as placas apresentarem um número menor de colónias, estas eram maiores, e com um aspeto mais espalhado na membrana. Isto pode refletir o mecanismo de resistência das

bactérias a atuar, uma vez que só aquelas resistentes a altas concentrações apresentavam o seu aspeto alterado (Figura 18). Como já foi descrito acima, a ciprofloxacina atua nas bactérias Gram-negativas através da inibição da ADN girase. Vários mecanismos de resistência foram observados em *E. coli*, o mais plausível foi a presença de mutações na sequência de ADN da girase A, no entanto existem vários tipos de mutações que a *E. coli* pode sofrer (MORGAN-LINNELL *et al.*, 2009).



**Figura 18** - Pormenor da membrana com crescimento de bactérias a baixa concentração (8 mg/L) (a) e membrana com crescimento de bactérias a alta concentração de ciprofloxacina (120 mg/L) (b).

### 3.3.1 Identificação Bioquímica – Sistema Comercial

A identificação bioquímica foi realizada a 5 isolados resistentes a ciprofloxacina, 3 deles foram confirmados pelo método baseado na norma ISO 9308-1:2000 como *E. coli* e os restantes 2 como bactérias coliformes. A confirmação da identificação dos isolados com o sistema Microgen™-ID é apresentado na tabela 5. Os modelos Microgen™ preenchidos podem ser consultados no Anexo E.2. Exemplos do *output* do *software* de identificação podem ser observados no Anexo E.4. O *software* considera várias hipóteses para a identificação do isolado, e fornece informação adicional para melhorar a identificação. O uso do *software* possibilita também acesso a bases de dados continuamente atualizadas.

Na base de dados TOKU-E - *Antimicrobial Index* (TOKU-E, 2014) foi possível consultar vários estudos sobre bactérias resistentes a antibióticos. Nesta base de dados foi possível verificar que para *E. coli* a concentração mínima inibitória de ciprofloxacina varia entre 0.5 e 2100 mg/L. A *E. coli* resistente a 2100 mg/L de ciprofloxacina refere-se a *E. coli* (O157:H7).

Portanto, a ocorrência de bactérias resistentes a concentrações de 150 mg/L de ciprofloxacina no rio Douro é possível.

Devido ao pequeno número de estirpes usadas para confirmar a sua identificação, e algumas destas terem percentagens de probabilidade baixas, estes dados não podem ser considerados completamente válidos. Sugere-se que sejam realizados mais testes para confirmar a identificação das estirpes isoladas, como por exemplo por análise da sequência do gene do rRNA 16S.

**Tabela 5 - Resultados da identificação bioquímica com Microgen™-ID para bactérias resistentes a ciprofloxacina.**

Código	C3	C4	C7	C5	C6
Identificação pelo método baseado na norma ISO 9308-1:2000	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Coliforme	Coliforme
Resultado Microgen™ID	<i>E. coli</i> <i>inactive</i>	<i>E. coli</i> <i>inactive</i>	<i>E. coli</i> <i>inactive</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Probabilidade Microgen™ID (%)	97,41	52,07	85,00	94,46	99,14
Concentração de antibiótico no meio de isolamento (mg/L)	150	150	150	120	150
E-TOKU*	<i>E. coli</i> (C316)	<i>E. coli</i> (C316)	<i>E. coli</i> (C316)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (012-3132)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (012-3132)
Data de colheita da amostra	29.01.14	29.01.14	31.01.14	30.01.14	29.01.14
E-TOKU*: Estirpe com valor de prevalência de ciprofloxacina idêntico ao resultado do estudo na base de dados.					

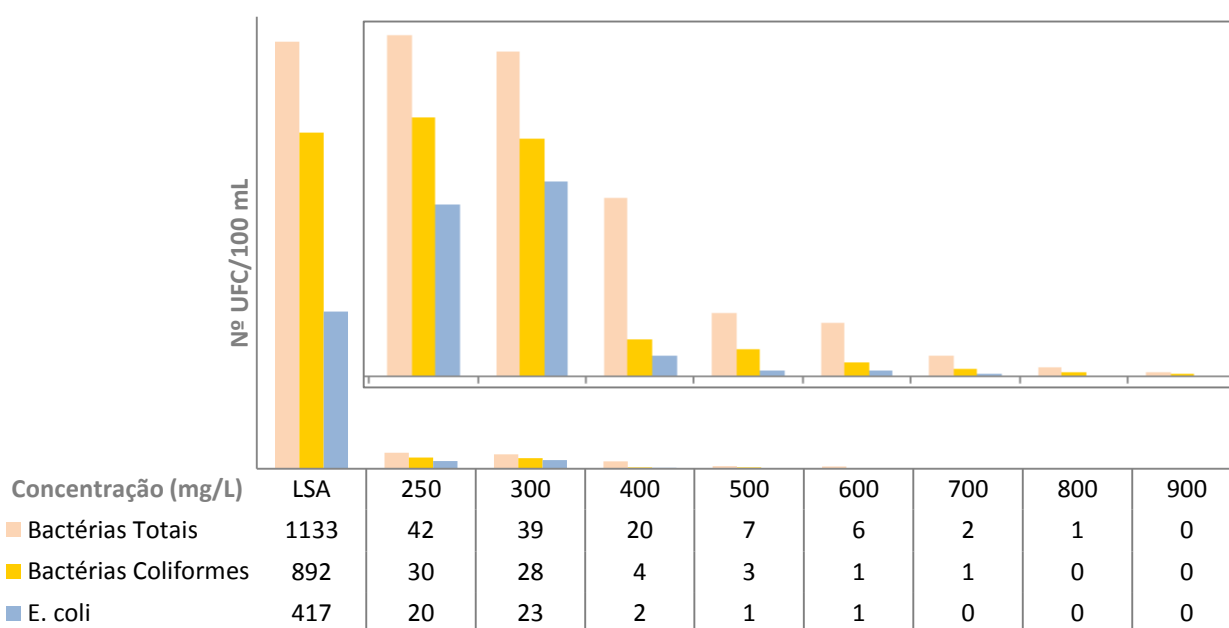
### 3.4 Bactérias resistentes a Estreptomicina

Para o estudo do efeito da estreptomicina foram testados valores desde 2 mg/L a 1000 mg/L. Neste relatório só vão ser apresentados valores de concentração superiores a 250 mg/L. O estudo feito para baixas concentrações de estreptomicina (2 mg/L a 200 mg/L) apresentava valores de prevalência bastante elevados (e.g. para a concentração de 8 mg/L de estreptomicina a prevalência de bactérias totais situava-se nos 38%), pelo que foi necessário aumentar sobremaneira as concentrações de antibiótico ao longo do estudo. No entanto podem ser consultados os valores obtidos para estas concentrações no Anexo C.2.

No Gráfico 9 é possível observar o comportamento das bactérias totais, bactérias coliformes e *E. coli* quando sujeitas a meio suplementado com estreptomicina. Até concentrações de 300 mg/L de antibiótico observa-se uma média de bactérias totais de 39 UFC, o que corresponde a uma prevalência de 3,9%. Para *E. coli* o valor de 23 UFC corresponde a uma prevalência média de UFC de 6,1%. No entanto, a concentrações de 400 mg/L observa-se um comportamento diferente. O valor médio de bactérias coliformes e *E. coli* é reduzido drasticamente enquanto para as bactérias totais não existe uma redução tão drástica. Estes dados corroboram a hipótese das bactérias coliformes serem bastante suscetíveis a concentrações de estreptomicina superiores a 400 mg/L (prevalência de 0,9%) enquanto as bactérias atípicas continuam a ser bastantes resistentes ainda a esta concentração.

À concentração de 700 mg/L já é possível observar inexistência de *E. coli*, no entanto ainda ocorre crescimento de bactérias coliformes resistentes. Isto indica que os mecanismos de defesa contra a estreptomicina são mais eficazes em bactérias coliformes que em *E. coli*. Só a 1000 mg/L não foi possível observar nenhum crescimento bacteriano o que indica que a concentração crítica para crescimento de coliformes se situa entre as concentrações de 900 mg/L e 1000 mg/L.

As taxas de prevalência média de bactérias para as diferentes concentrações de estreptomicina encontram-se na Tabela 6.



**Gráfico 9** - Média de UFC/ 100 mL para diferentes concentrações de estreptomicina. (Na caixa foram apresentados os mesmos valores, mas ampliados.)

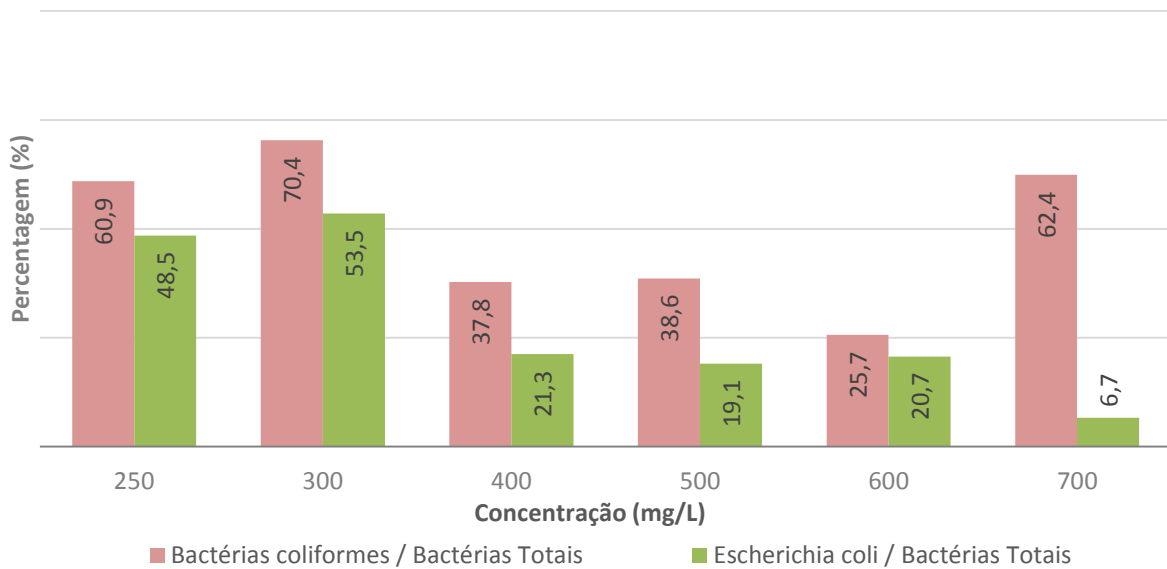
**Nota:** No gráfico 9 o número de UFC médio está arredondado à unidade, pelo que os valores de bactérias totais e bactérias coliformes à concentração de 900 mg/L são 0,4 e 0,3 respetivamente, aparecendo no entanto com o valor zero.

**Tabela 6** - Taxas de prevalência média das bactérias para estreptomicina.

	Concentração (mg/L)								
	250	300	400	500	600	700	800	900	1000
Bactérias Totais	4,7	3,8	2,3	1,0	0,7	0,3	0,2	0,1	0,0
Bactérias coliformes	7,3	4,0	1,5	0,6	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0
<i>E. coli</i>	7,8	5,5	1,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0

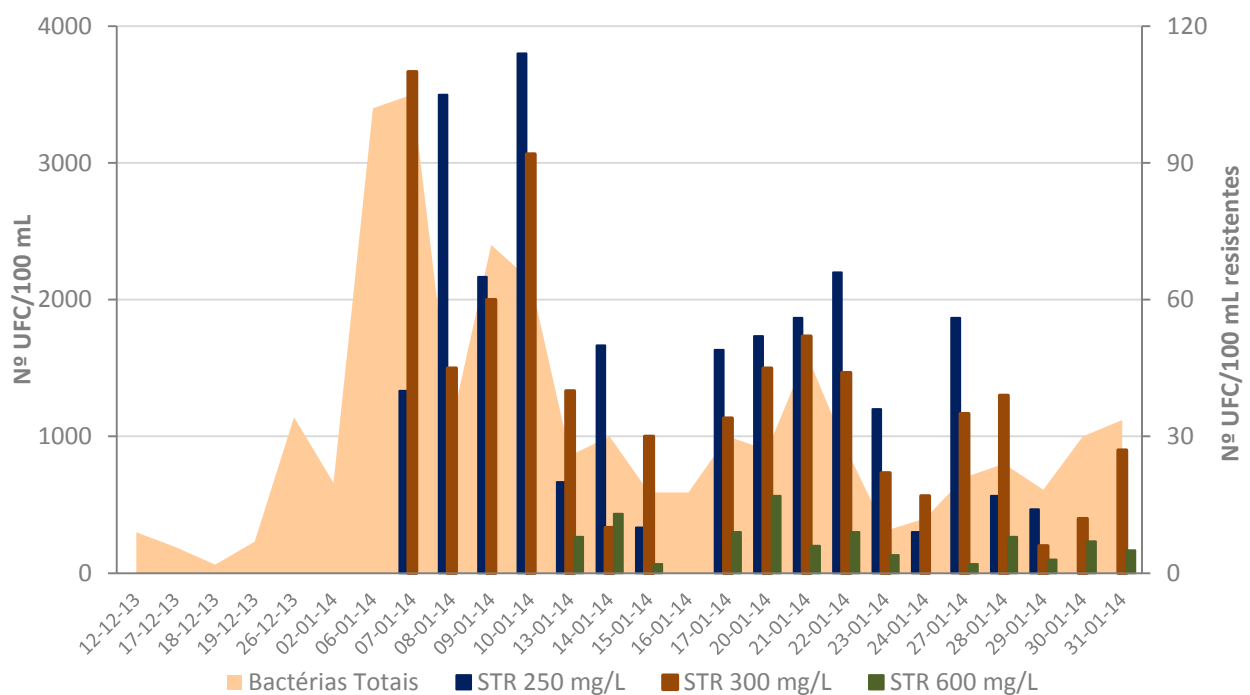
Observando também o Gráfico 10 é possível corroborar os dados anteriores, uma vez que é possível observar uma predominância das bactérias totais em relação à *E. coli* a partir dos 400 mg/L.

O registo dos valores de UFC, bem como todos os valores utilizados para as taxas de prevalência e diversidade microbiana podem ser consultados no Anexo C.3.

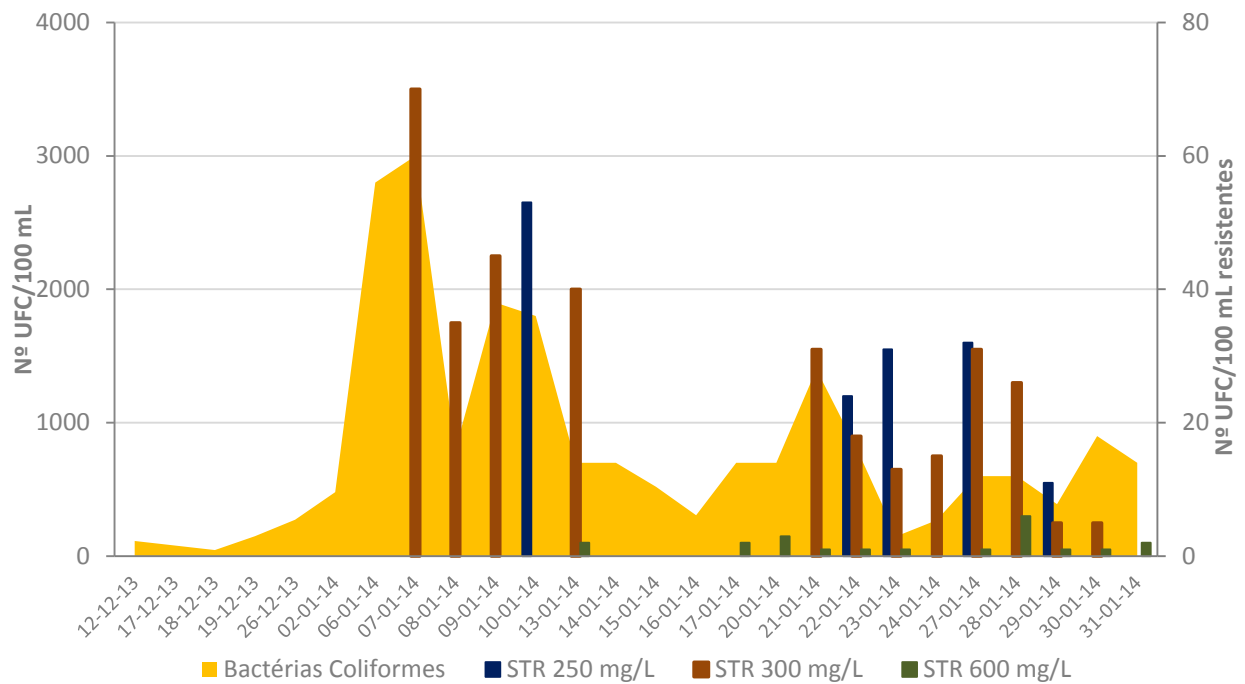


**Gráfico 10** - Proporção de bactérias coliformes e *E. coli* relativamente às bactérias totais no estudo com estreptomicina.

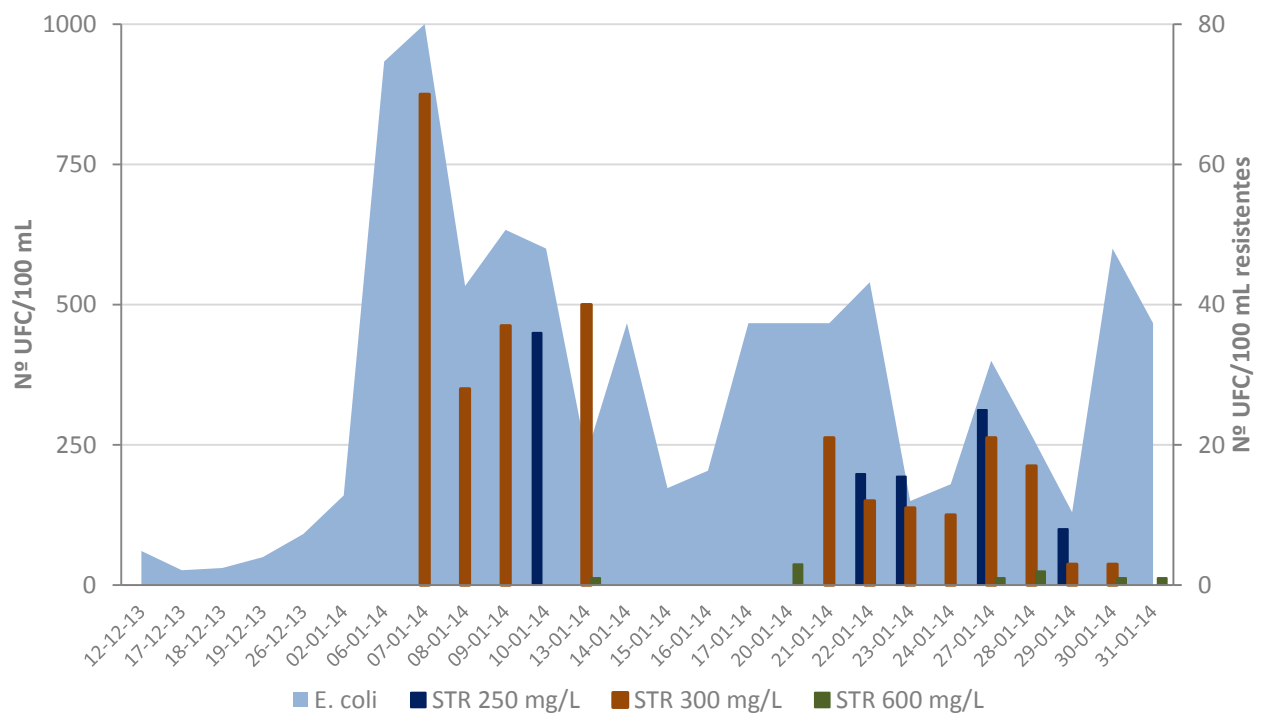
Nos Gráficos 11, 12 e 13 observa-se também uma proporcionalidade entre as confirmações de *E. coli*, bactérias coliformes e bactérias totais resistentes a estreptomicina e o número de bactérias respetivas presentes na amostra de água natural sem estreptomicina. Os resultados são semelhantes aos obtidos com a ciprofloxacina, pelo que estes gráficos corroboram o que foi dito anteriormente.



**Gráfico 11** - Comparação entre o número de bactérias totais e o número de bactérias totais resistentes a estreptomicina.



**Gráfico 12 - Comparação entre o número de bactérias coliformes e o número de bactérias coliformes resistentes a estreptomicina.**

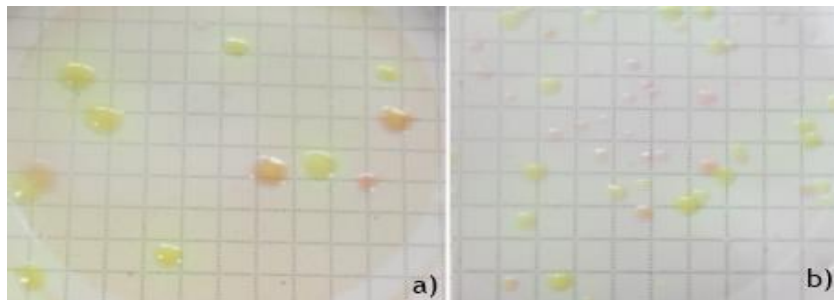


**Gráfico 13 - Comparação entre o número de *E. coli* e o número de *E. coli* resistentes a estreptomicina.**

O aspeto do crescimento das bactérias sob o efeito de estreptomicina também é diferente, uma vez que a redução das bactérias não era tão acentuada com as diferentes concentrações, mas a cada aumento de concentração de estreptomicina as bactérias apresentavam um maior esforço para proliferar, com as colónias bastante mais pequenas e inibidas. Isto pode dever-se



ao mecanismo de ação do antibiótico uma vez que este atua através da inibição da síntese proteica, podendo resultar numa diminuição da capacidade de crescimento, a partir de determinadas concentrações (Figura 19).



**Figura 19-** Pormenor da membrana com crescimento de bactérias em meio sem antibiótico (a) e membrana com crescimento de bactérias a concentração de estreptomicina (250 mg/L) (b).

#### 3.4.1 Identificação Bioquímica – Sistema Comercial

A identificação bioquímica, tal como para a ciprofloxacina foi realizada a 5 isolados resistentes a estreptomicina, 3 deles tinham sido confirmados pelo método comum como *E. coli* e os restantes 2 como bactérias coliformes. A confirmação dos isolados com Microgen™-ID é apresentado na tabela 7. Os modelos Microgen™ preenchidos podem ser consultados no Anexo E.3. Na base de dados TOKU-E - *Antimicrobial Index* (TOKU-E, 2014) foi possível consultar vários estudos sobre bactérias resistentes a antibióticos. Nesta base de dados foi possível verificar que para *E. coli* a concentração mínima inibitória de estreptomicina varia entre 2 e até pelo menos 800 mg/L.

Portanto, a ocorrência de bactérias resistentes a concentrações de 600 mg/L de estreptomicina no rio Douro é possível.

Devido ao pequeno número de estirpes usadas para confirmar a sua identificação, e algumas destas terem percentagens de probabilidade baixas, estes dados não podem ser considerados completamente válidos. Sugere-se que sejam realizados mais testes para confirmar a identificação das estirpes isoladas, como por exemplo por análise da sequência do gene do rRNA 16S.

**Tabela 7 - Resultados da identificação bioquímica com Microgen™-ID para bactérias resistentes a estreptomicina.**

Código	S1	S4	S8	S2	S10
Identificação pelo método baseado na norma ISO 9308-1:2000	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Coliforme	Coliforme
Resultado Microgen™ID	<i>E. hermannii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. coli</i> inactive	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>
Probabilidade Microgen™ID (%)	57,41	57,41	72,30	88,58	88,08
Concentração de antibiótico no meio de isolamento (mg/L)	600	500	600	600	700
E-TOKU*	---	---	<i>E. coli</i> unidentified	<i>Shigella sonnei</i> (>250 mg/L)	---
Data de colheita da amostra	23.01.14	27.01.14	31.01.14	23.01.14	31.01.14
E-TOKU*: Estirpe com valor de prevalência de estreptomicina idêntico ao resultado do estudo na base de dados.					

### 3.5 Controlo de Qualidade

No presente estudo, em paralelo foram também realizadas análises de controlo de qualidade para a validação de resultados. Estas análises tiveram como objetivo fornecer dados de qualidade reconhecida, assegurar um desempenho de elevada qualidade, manter uma avaliação continuada das operações laboratoriais realizadas tendo sido realizados de acordo com o indicado no capítulo 3.7.

#### 3.5.1 MR - Controlo Qualitativo

O controlo positivo foi realizado com *E. coli* NCTC 9001 e o controlo negativo com *Klebsiella oxytoca* NCTC 8167. Todos os testes efetuados apresentaram o resultado esperado e apresentam-se na Tabela 8.

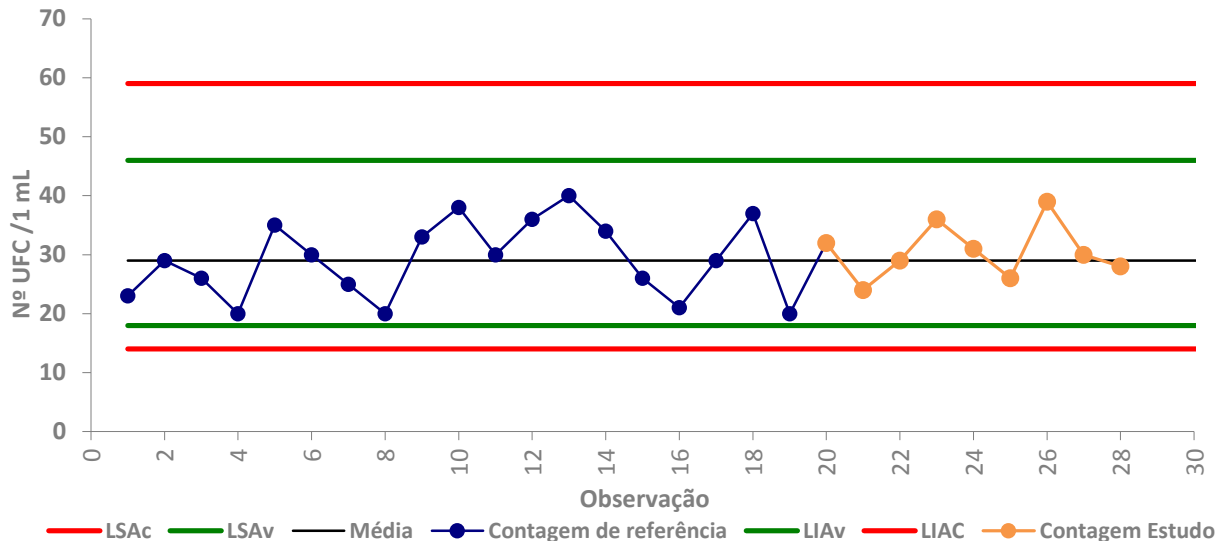
**Tabela 8 - Resultados do controlo qualitativo para *E. coli* e *K. oxytoca*.**

Data	<i>E. coli</i>				<i>K. oxytoca</i>			
	Ácido em LSA	Oxidase	$\beta$ -glucuronidase	Indol	Ácido em LSA	Oxidase	$\beta$ -glucuronidase	Indol
12-12-2013	+	-	+	+	+	-	-	-
17-12-2013	+	-	+	+	+	-	-	-
26-12-2013	+	-	+	+	+	-	-	-
02-01-2014	+	-	+	+	+	-	-	-
09-01-2014	+	-	+	+	+	-	-	-
16-01-2014	+	-	+	+	+	-	-	-
23-01-2014	+	-	+	+	+	-	-	-
30-01-2014	+	-	+	+	+	-	-	-

### 3.5.2 Controlo Quantitativo

O Gráfico 14 representa a Carta Guia utilizada para o controlo quantitativo de bactérias coliformes no meio LSA sem antibiótico utilizando *K. oxytoca*. No Gráfico, as linhas a vermelho representam os limites de ação e as linhas a verde representam os limites de aviso.

Foi também feita a avaliação dos meios suplementados com antibiótico. Para a ciprofloxacina não houve qualquer crescimento, mesmo na concentração mais baixa testada, de 2 mg/L. Para a estreptomicina o valor limite de crescimento para a lenticula foi de 4 mg/L (Tabela 9).

**Gráfico 14 - Carta Guia de *K. oxytoca* para meio LSA sem antibiótico.**

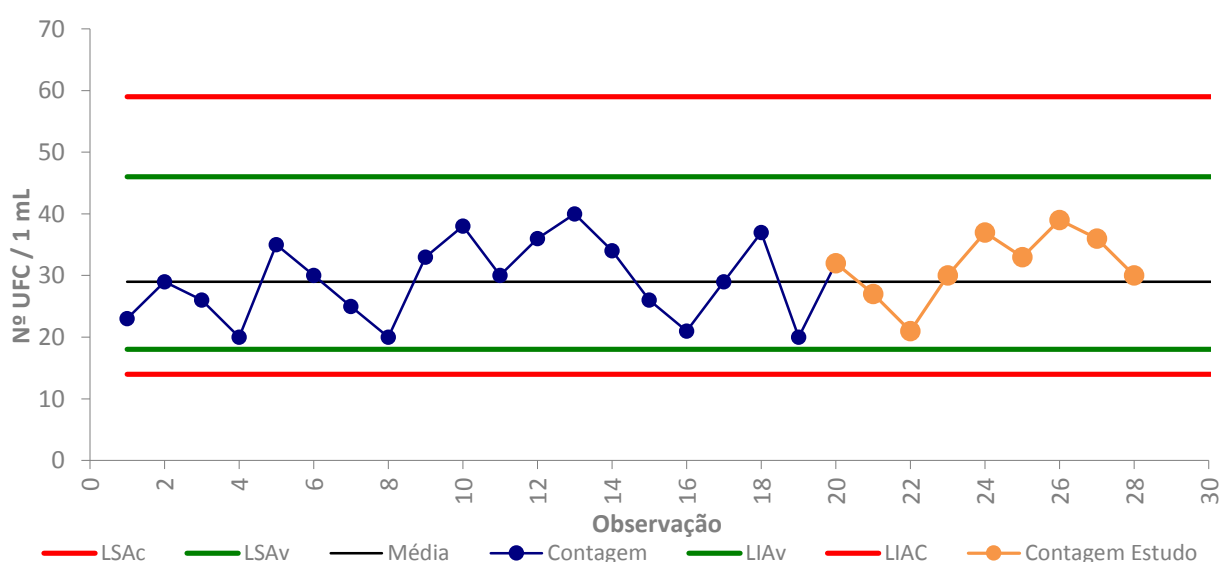
**Tabela 9 - Resultados do controlo quantitativo para *E. coli* e *K. oxytoca*.**

Data	<i>E. coli</i> (UFC/1mL)			<i>K. oxytoca</i> (UFC/1mL)		
	CIP 2 mg/L	STR 8 mg/L	STR 12 mg/L	CIP 2 mg/L	STR 2 mg/L	STR 4 mg/L
12-12-2013	0	1	0	0	3	0
17-12-2013	0	2	0	0	1	0
26-12-2013	0	1	0	0	2	0
02-01-2014	0	3	0	0	3	0
09-01-2014	0	1	0	0	4	0
16-01-2014	0	0	0	0	1	0
23-01-2014	0	1	0	0	3	0
30-01-2014	0	0	0	0	2	0

Para controlo da determinação de *E. coli* foi utilizada a estirpe *E. coli* NCTC 9001. Esta estirpe, sendo não resistente, permitiu avaliar, para além da exatidão do método, o desempenho tanto do meio sem antibiótico como dos meios suplementados com antibiótico.

Os resultados apresentados são representados em UFC/1 mL. Observou-se o crescimento em meio LSA sem antibiótico (Gráfico 15) e verificou-se que a *E. coli* não crescia a qualquer concentração de ciprofloxacina superior a 2 mg/L (Tabela 9).

No controlo positivo para o meio LSA com estreptomicina verificou-se que não crescia qualquer colónia para concentrações de estreptomicina superiores a 12 mg/L (Tabela 9).

**Gráfico 15 - Carta Guia de *E. coli* para meio LSA sem antibiótico.**

### 3.5.3 Análise de duplicados

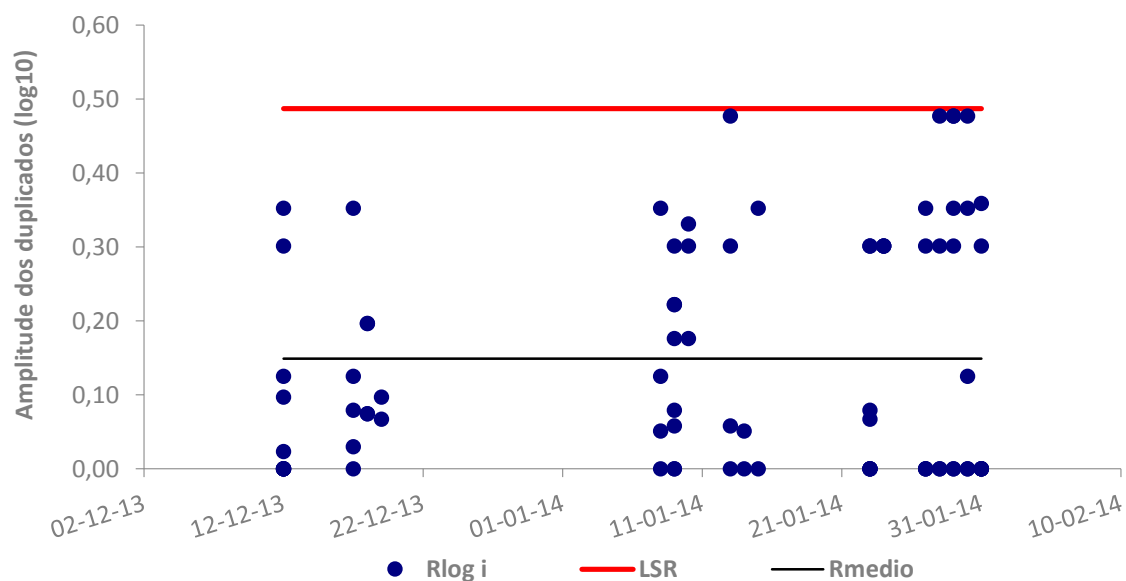
A avaliação de duplicados foi feita para todos os duplicados realizados durante o presente estudo. A análise foi realizada para a enumeração de bactérias coliformes e *E. coli*. Os critérios definidos no capítulo de Materiais e Métodos (3.7.3) foram obtidos pelo laboratório ao longo

tempo, pelo que apenas foi necessário inserir os valores obtidos nas cartas de duplicados para avaliar a sua conformidade. De referir que foram usadas 2 gamas de valores, a gama baixa que compreende valores de contagem entre 0 e 19 colónias e a gama alta entre 20 e 100 colónias.

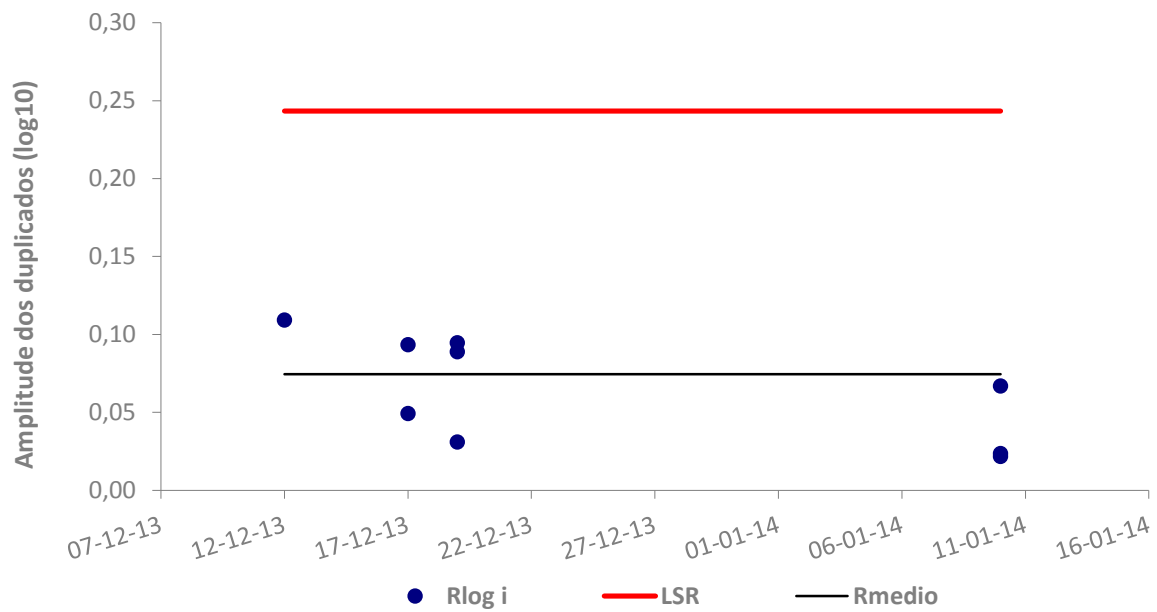
Foram realizados um total de 91 duplicados para um total de 202 confirmações (45%), que se dividem em 82 de gama baixa e os restantes 9 de gama alta. Nos Gráficos 16,17,18 e 19 podemos observar a conformidade de acordo com os critérios de precisão previamente estabelecidos (Tabela 10). Para consulta detalhada de todos os duplicados realizados verificar o Anexo D.

**Tabela 10 - Critérios precisão para duplicados.**

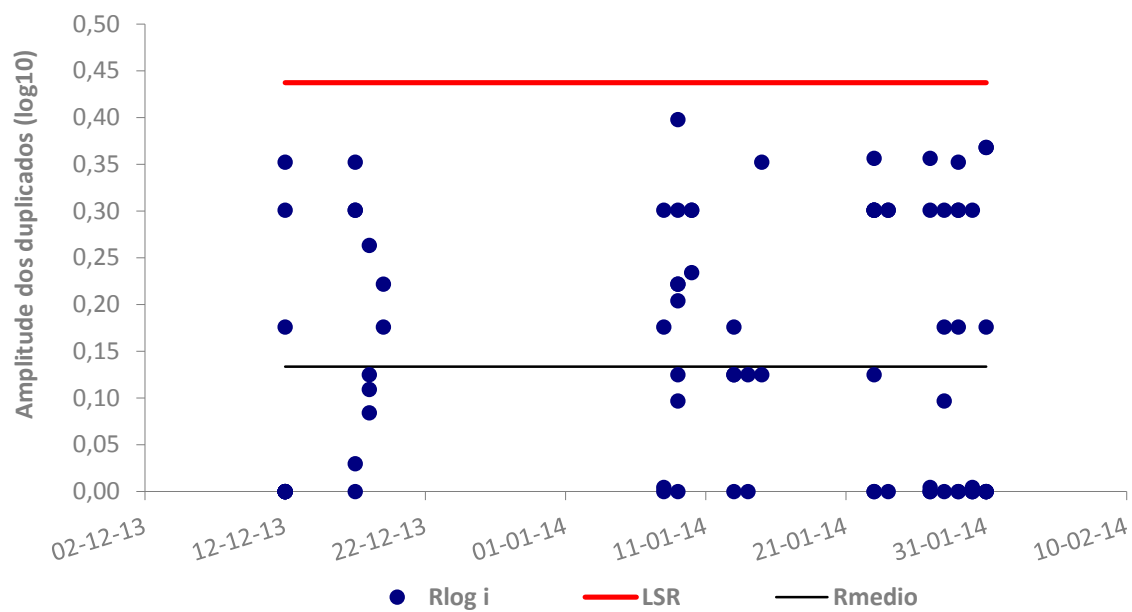
Gama	Limite	Bactérias coliformes	<i>E. coli</i>
Baixa (0-19)	$LS_R$	0,4868	0,4373
	$LI_R$	0,0000	0,0000
Alta (20-100)	$LS_R$	0,2434	0,2504
	$LI_R$	0,0000	0,0000



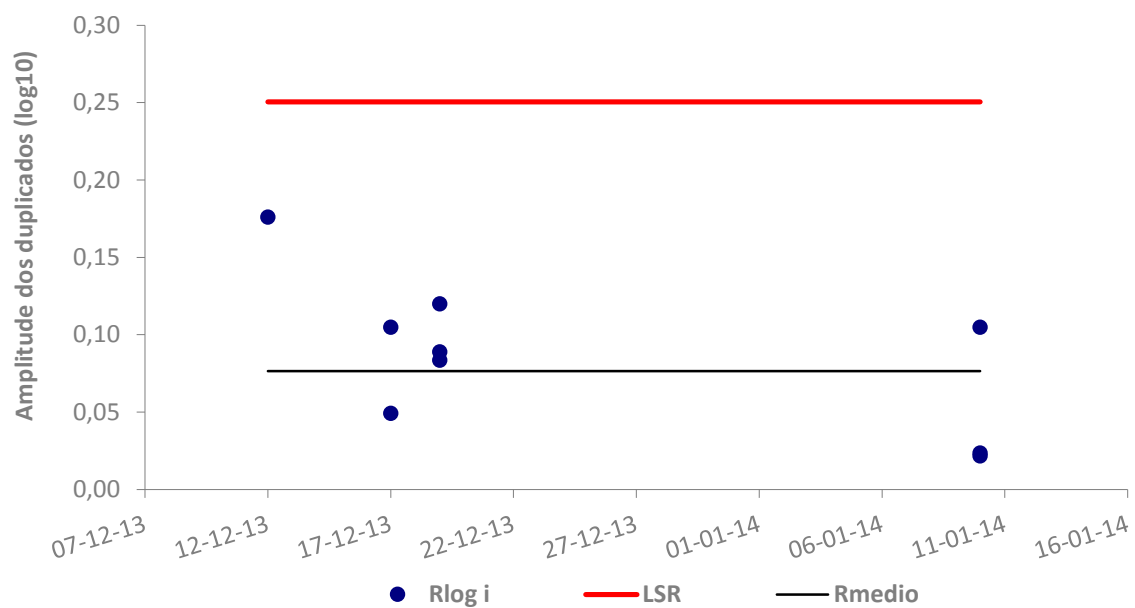
**Gráfico 16 - Amplitude dos duplicados de gama baixa de bactérias coliformes realizados durante o estudo.**



**Gráfico 17** -Amplitude dos duplicados de gama alta de bactérias coliformes realizados durante o estudo.



**Gráfico 18** -Amplitude dos duplicados de gama baixa de *E. coli* realizados durante o estudo.



**Gráfico 19** - Amplitude dos duplicados de gama alta de *E. coli* realizados durante o estudo.

### 3.5.4 Testes de esterilidade

Todos os testes de esterilidade efetuados acusaram negativo, garantindo-se assim a esterilidade de todo processo analítico.

## 4 Conclusões

Este estudo permitiu verificar que a precipitação, e principalmente a turvação, influenciam a diversidade da população de bactérias coliformes presentes no Rio Douro. Durante o estudo foram observados valores díspares de *E. coli* entre 27 e 1000 UFC por 100 mL. O aumento de turvação pode ser devido à precipitação e ao facto do local de amostragem estar a montante de uma barragem.

Parte da população de bactérias coliformes, incluindo *E. coli*, eram resistentes aos antibióticos ciprofloxacina e estreptomicina.

Quanto à ciprofloxacina a prevalência média de bactérias coliformes que toleraram uma concentração 2 mg/L foi de 12,6%. A fração deste grupo de organismos foi diminuindo com o aumento da concentração de ciprofloxacina, sendo apenas de 0,1% na presença de 150 mg/L de antibiótico. Relativamente à população de *E. coli* obteve-se uma prevalência média de 20,9% e de 0,2% para concentrações de 2 mg/L e 150 mg/L de ciprofloxacina, respetivamente.

Relativamente à estreptomicina foi possível concluir que para 250 mg/L a prevalência de bactérias coliformes resistentes foi de 4,9%, sendo de 0,1% à concentração de 900 mg/L deste antibiótico. Para *E. coli*, os valores da taxa de prevalência de bactérias resistentes variou entre os 7,7% e os 0,2% para valores de estreptomicina de 250 mg/L e 600 mg/L, respetivamente. Não se observou qualquer crescimento destes organismos para valores de concentração superiores a 600 mg/L.

Estes resultados permitem concluir que a prevalência de bactérias coliformes a baixas concentrações destes antibióticos foi diminuta, o que sugere que a maioria das bactérias presentes no Rio Douro é suscetível à ação dos antibióticos estudados. No entanto, dentro das populações resistentes aos antibióticos estudados encontrou-se 2,1% da população com capacidade de resistir a elevadas de ciprofloxacina (de 8 mg/L até 150 mg/L) e 7,3% da população com capacidade de resistir a elevadas concentrações de estreptomicina (de 250 mg/L até 900 mg/L).

### 4.1 Limitações e Trabalho Futuro

A principal limitação do trabalho foi o tempo total deste que não permitiu efetuar um número representativo de identificações das bactérias isoladas, o que impossibilitou a avaliação do efeito de cada antibiótico sobre as diferentes espécies de coliformes totais.

Devido ao grande número de análises que eram efetuadas diariamente foi impossível realizar confirmações em todos os volumes analisados, pelo que foi necessário escolher quais as placas a confirmar. Esta limitação pode ser observada nas Tabelas do Anexo C, onde existem concentrações de antibióticos com poucos resultados.



No futuro, seria interessante continuar a pesquisa de resistência de bactérias coliformes e *E. coli* para outros tipos de antibióticos, principalmente aqueles que são usados mais frequentemente em Portugal e que sejam de classes diferentes e alargar a pesquisa também a bactérias de outros grupos.

## **4.2 Outros Trabalhos Realizados**

A possibilidade de realizar em paralelo com o presente estudo análises de Controlo de Qualidade permitiu uma validação dos dados obtidos.

## **4.3 Apreciação final**

O trabalho desenvolvido ao longo da Dissertação foi bastante atrativo. O tema, embora não fosse algo diretamente ligado à Engenharia Química permitiu ainda assim a aplicação de metodologias e conhecimentos adquiridos durante o curso, em particular durante o Mestrado Integrado.

A possibilidade de trabalhar num laboratório acreditado permitiu-me ter uma visão sobre o trabalho em ambiente empresarial, o que de outra forma teria sido impossível. Toda a equipa do laboratório apoiou o projeto em todas as tarefas, tendo sido bastante agradável e estimulante e potenciando uma boa relação entre todos.

Os objetivos do trabalho foram atingidos, mesmo com as limitações de tempo que entretanto surgiam ficando a sensação que poderiam ter sido superados caso não tivesse existido esta limitação.

## 5 Referências

- 98/83/CE, EU - - 98/83/CE. Brussels: 1998.
- AdDP - Relatório Sustentabilidade AdDP 2012. 2012.
- Amaya, E.; Reyes, D.; Paniagua, M.; Calderon, S.; Rashid, M. U.; Colque, P.; Kuhn, I.; Mollby, R.; Weintraub, A.; Nord, C. E. - Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in Leon, Nicaragua. *Clin Microbiol Infect.* Vol. 18. n.º 9 (2012). pp. E347-54. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738232>>.
- APA, IP - Plano de Gestão da Região Hidrográfica do Douro. APA, IP, 2012.
- APDA - Bactérias Coliformes. 2012a.
- APDA - *Escherichia coli*. 2012b.
- APHA, Eaton Andrew D. American Water Works Association Water Environment Federation - Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF, 2005.
- AppliChem - Specification: Ciprofloxacin hydrochloride pure Ph. Eur. Germany: AppliChem, Association, A.W.W.; Edzwald, J. - Water Quality & Treatment: A Handbook on Drinking Water. McGraw-Hill Education, 2010. Disponível em WWW: <<http://books.google.pt/books?id=Lr2ossXJ6NwC>>.
- Bahiru, A.; Emire, S.; Ayele, A. K. - The prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from fecal and water sources. *Acad. J. Microbiol. Res.* Vol. 1. 1. (2013). p 10
- Baquero, F.; Martinez, J. L.; Canton, R. - Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* Vol. 19. n.º 3 (2008). pp. 260-5. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18534838>>.
- Bax, B. D.; Eggleston, Drake S.; Fosberry, Andrew; Gentry, Daniel R.; Gorrec, Fabrice; Giordano, Ilaria; Hann, Michael M.; Hennessy, Alan; Hibbs, Martin; Huang, Jianzhong; Jones, Emma; Jones, Jo; Brown, Kristin Koretke; Lewis, Ceri J.; May, Earl W.; Saunders, Martin R.; Singh, Onkar; Spitzfaden, Claus E.; Shen, Carol; Shillings, Anthony; Theobald, Andrew J.; Wohlkonig, Alexandre; Pearson, Neil D.; Gwynn, Michael N. - Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. n.º 1476-4687 (Electronic)
- Brunton, L.; Lazo, J.; Parker, K. - Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eleventh Edition. McGraw-Hill Education, 2005. Disponível em WWW: <<http://books.google.pt/books?id=PtWdBgnQdjMC>>.
- Carneiro, M. - *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas naturais: caracterização dos rios Douro, Paiva, Ferreira, Ferro e Vizela. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Biologia, 2012.
- ChemicalBook - Streptomycin. 2010. Disponível em WWW: <[http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3462887.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3462887.htm)>.
- Comroe, J. H., Jr. - Pay dirt: the story of streptomycin. Part I. From Waksman to Waksman. *Am Rev Respir Dis.* Vol. 117. n.º 4 (1978). pp. 773-81.
- Counsel, Food Safety - *E. coli*. 2009. Disponível em WWW: <[http://www.foodsafetycounsel.com/uploads/image/E\\_%20coli%203.jpg](http://www.foodsafetycounsel.com/uploads/image/E_%20coli%203.jpg)>.
- Davies, J.; Davies, D. - Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* Vol. 74. n.º 3 (2010). pp. 417-33. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805405>>.
- DL\_306/2007 - Decreto-Lei n.º 306/2007. Lisboa: Diário da República, 2007.

- ISO, International Standard Organization - ISO 9308-1:2000 - Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. ISO, 2000.
- Khetan, S. K.; Collins, T. J. - Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chem Rev.* Vol. 107. n.º 6 (2007). pp. 2319-64. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17530905>>.
- Kummerer, K. - Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother.* Vol. 54. n.º 2 (2004). pp. 311-20. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215223>>.
- Kummerer, K. - Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere.* Vol. 75. n.º 4 (2009a). pp. 417-34. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185900>>.
- Kummerer, K. - Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere.* Vol. 75. n.º 4 (2009b). pp. 435-41. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178931>>.
- Lee, S. H.; Levy, D. A.; Craun, G. F.; Beach, M. J.; Calderon, R. L. - Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ.* Vol. 51. n.º 8 (2002). pp. 1-47. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489843>>.
- Leite, Luís - Cadastro das Fontes Poluidoras da Bacia Hidrográfica do Douro 2008.
- Luzzatto, L.; Apirion, D.; Schlessinger, D. - Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 60. n.º 3 (1968). pp. 873-80. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4875806>>.
- Madureira, T. V.; Barreiro, J. C.; Rocha, M. J.; Rocha, E.; Cass, Q. B.; Tiritan, M. E. - Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Sci Total Environ.* Vol. 408. n.º 22 (2010). pp. 5513-20. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732709>>.
- Manaia, Célia M.; Vaz-Moreira, Ivone; Nunes, Olga C. - Antibiotic Resistance in Waste Water and Surface Water and Human Health Implications. Vol. 20. (2011). pp. 173-212. Disponível em WWW: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F698\\_2011\\_118](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F698_2011_118)>.
- Marsalek, J; BE, Jimenez-Cisneros; Malmquist, PA; Karamouz, M; Goldenfum, M; Chocat, B - Urban Water Cycle Processes and Interactions. International Hydrological Programme (IHP) of the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. UNESCO). IHP-VI, 2006.
- Martins, Ana - Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e enterococos. Porto: IPP, ESTSP, 2012.
- Microgen, Bioproducts Ltd - Microgen™ GNA+B-ID System. Camberley UK: 2011.
- Morgan-Linnell, S. K.; Becnel Boyd, L.; Steffen, D.; Zechiedrich, L. - Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol. 53. n.º 1 (2009). pp. 235-41.
- O'Neil, M.J. - The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Royal Society of Chemistry, 2013.
- Oliphant, C. M.; Green, G. M. - Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician.* Vol. 65. n.º 3 (2002). pp. 455-64. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858629>>.
- RMcontrole - Antimicrobianos - Bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em WWW: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/quinilonas.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinilonas.htm)>.
- Rusin, P. A.; Rose, J. B.; Haas, C. N.; Gerba, C. P. - Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol.* Vol. 152. (1997). pp. 57-83. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9297985>>.

- Sande-Bruinsma, N.; Grundmann, H.; Verloo, D.; Tiemersma, E.; Monen, J.; Goossens, H.; Ferech, M.; European Antimicrobial Resistance Surveillance System, Group; European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project, Group - Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis*. Vol. 14. n.º 11 (2008). pp. 1722-30. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976555>>.
- Sharma, D.; Cukras, A. R.; Rogers, E. J.; Southworth, D. R.; Green, R. - Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. *J Mol Biol*. Vol. 374. n.º 4 (2007). pp. 1065-76. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967466>>.
- Sigma-Aldrich - Produt Information: Streptomycin Sulfate. USA: Sigma-Aldrich 1997.
- Sukul, P.; Spiteller, M. - Fluoroquinolone antibiotics in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol*. Vol. 191. (2007). pp. 131-62. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708074>>.
- Sultana, Y; - Sterilization Methods and Principles. Faculty of Pharmacy Jamia Hamdard, 2007.
- Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H.D.; Metcalf; Eddy, Inc. - Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. McGraw-Hill Education, 2003. Disponível em WWW: <<http://books.google.pt/books?id=L1MAXTAKL-QC>>.
- TOKU-E - The Antimicrobial Index. 2014. Disponível em WWW: <<http://antibiotics.toku-e.com/>>.
- Valley, Douro - Venha descobrir o Douro. 2011. Disponível em WWW: <<http://dourovalley.eu/poi?id=6906>>.
- Vaz-Moreira, Ivone - Bacterial diversity and antibiotic resistance from the water source to the tap Porto: UCP, Escola Superior de Biotecnologia, 2012. PhD
- Voet, D.; Pratt, Charlotte W.; Voet, J.G. - Principles of Biochemistry. John Wiley & Sons, Limited, 2013. Disponível em WWW: <<http://books.google.pt/books?id=Mk74ygAACAAJ>>.
- WHO - Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. World Health Organization, 2008.
- WHO - Guidelines for drinking-water quality: recommendations. 4th. World Health Organization, 2011.

## Anexos

## Anexo A - Análises Efetuadas

### A.1. Meio sem Antibiótico (LSA)

*Tabela 11 - Valores para as diversas contagens totais em LSA.*

DATA	LSA		LSA				
	Alíquotas analisadas	Alíquotas confirmadas	TT	TA	C	BC	EC
12-12-2013	6	4	25	47	8	8	4
17-12-2013	4	1	41	11	3	3	1
18-12-2013	2	1	36	13	3	3	2
19-12-2013	2	1	50	25	3	3	1
26-12-2013	2	1	82	32	3	1	1
02-01-2014	3	1	60	21	3	3	1
06-01-2014	2	1	28	6	3	3	1
07-01-2014	2	1	30	5	3	3	1
08-01-2014	1	1	8	3	3	2	2
09-01-2014	1	1	19	5	3	3	2
10-01-2014	2	1	18	34	3	3	1
13-01-2014	2	1	64	16	3	3	1
14-01-2014	2	1	66	41	3	3	2
15-01-2014	2	1	52	7	3	3	1
16-01-2014	2	1	51	15	3	2	2
17-01-2014	2	1	71	30	3	3	2
20-01-2014	1	1	7	2	3	3	2
21-01-2014	2	1	14	2	3	3	1
22-01-2014	2	1	96	12	3	3	2
23-01-2014	4	2	7	3	3	3	3
24-01-2014	3	1	29	16	3	3	2
27-01-2014	2	1	61	20	3	3	2
28-01-2014	3	2	65	19	6	6	3
29-01-2014	2	1	41	22	3	3	1
30-01-2014	4	1	99	8	3	3	2
31-01-2014	2	1	65	52	3	3	2
TOTAL	62	31	1185	467	86	82	45

Legenda:

TT	UFC totais típicas;	TA	UFC totais atípicas;	C	Nº colónias confirmadas;
BC	Nº bactérias coliformes confirmadas;	EC	Nº <i>E. Coli.</i> confirmadas.		

## A.2. Ciprofloxacina

Tabela 12 - Análises efetuadas em meio LSA com ciprofloxacina.

DATA	LSA + Ciprofloxacina																																									
	Aliquotas analisadas	Aliquotas confirmadas	Concentração (mg/L)																																							
			2					4					6					8					12					16					20					30				
			TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC					
12-12-2013	12	4	9	3	6	6	2	7	0	6	6	5																														
17-12-2013	16	5	20	6	6	5	2	9	4	6	4	2	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0																				
18-12-2013	7	4	5	9	3	1	0	6	2	2	1	1	1	4	1	0	0	3	2	3	2	1																				
19-12-2013	7	3	45	16	3	2	2	16	10	3	1	1	12	14	3	2	1	2	0	2	2	2																				
26-12-2013	7	3	42	19	3	3	2	36	18	3	3	2	33	21	3	3	3	NDTR																								
02-01-2014	4	1											0	0	0	0	0	3	0	3	2	2																				
06-01-2014	4	2											6	0	3	3	3	3	1	3	3	3																				
07-01-2014	2	2											5	1	3	2	2	3	1	3	3	3																				
08-01-2014	2	2											4	1	3	3	2	1	1	1	1	1																				
09-01-2014	4	2											3	0	3	2	1	3	0	3	3	2	8	0	0	0	0															
10-01-2014	6	4											3	0	3	3	0	3	0	3	3	3	8	4	3	3	2															
13-01-2014	8	5											2	0	2	2	1	2	0	2	2	1	4	0	3	3	3	17	1	2	2	2										
14-01-2014	9	3											7	0	3	3	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	24	6	2	2	1	17	6	0	0	0					
15-01-2014	10	3											2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	9	3	7	7	6	
16-01-2014	8	2											2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	1	3	2	2	15	0	3	3	3	
17-01-2014	6	2											NDRT					28	2	0	0	0	20	3	0	0	0	18	2	0	0	0	18	3	3	3	3	3	0	3	3	3
20-01-2014	7	1											47	12	0	0	0	20	9	0	0	0	18	2	0	0	0	15	2	0	0	0	12	1	0	0	0	25	2	0	0	0
21-01-2014	7	2											24	6	0	0	0	13	8	0	0	0	8	1	0	0	0	8	1	0	0	0	13	5	0	0	0	4	0	3	3	2
22-01-2014	10	2											21	6	0	0	0	11	0	0	0	0	7	3	0	0	0	9	2	0	0	0	8	2	0	0	0	9	2	0	0	0
23-01-2014	13	6											35	11	0	0	0	9	0	0	0	0	4	1	0	0	0	7	1	0	0	0	15	0	0	0	0	5	0	0	0	0
24-01-2014	15	5											21	3	0	0	0	11	1	0	0	0	6	1	0	0	0	4	0	0	0	0	4	1	3	3	3	9	0	0	0	0
27-01-2014	17	4											26	5	0	0	0	8	2	0	0	0	15	2	0	0	0	11	1	0	0	0	8	0	0	0	0	4	0	0	0	0
28-01-2014	16	4											14	1	0	0	0	9	3	0	0	0	5	1	0	0	0	7	0	0	0	0	9	2	0	0	0	4	0	0	0	0
29-01-2014	17	6											17	2	0	0	0	13	4	0	0	0	9	0	0	0	0	7	0	0	0	0	11	1	0	0	0	6	0	0	0	0
30-01-2014	15	3											29	6	0	0	0	16	1	0	0	0	8	0	0	0	0	NDRT					11	5	0	0	0	9	6	0	0	0
31-01-2014	17	3											40	21	0	0	0	8	4	0	0	0	7	2	0	0	0	13	3	0	0	0	3	4	0	0	0	5	2	0	0	0
TOTAL	246	83	121	53	21	17	8	74	34	20	15	11	356	114	28	24	15	171	39	24	22	19	128	20	6	6	5	145	19	4	4	3	139	31	9	8	8	107	15	16	16	14

(continua na página seguinte)

(continuação)

DATA	LSA + Ciprofloxacina																														TOTAL											
	Concentração (mg/L)																																									
	40					60					80					100					120					150											200					
	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC							TT	TA	C	BC	EC	
12-12-2013																																			16	3	12	12	7			
17-12-2013																																			31	10	13	10	5			
18-12-2013																																			15	17	9	4	2			
19-12-2013																																			75	40	11	7	6			
26-12-2013																																			111	58	9	9	7			
02-01-2014																																			3	0	3	2	2			
06-01-2014																																			9	1	6	6	6			
07-01-2014																																			8	2	6	5	5			
08-01-2014																																			5	2	4	4	3			
09-01-2014																																			14	0	6	5	3			
10-01-2014																																			14	4	9	9	5			
13-01-2014																																			25	1	9	9	7			
14-01-2014																																			49	12	6	6	3			
15-01-2014																																			19	3	7	7	6			
16-01-2014																																			26	1	6	5	5			
17-01-2014																																			87	10	6	6	6			
20-01-2014	8	2	3	3	3																													145	30	3	3	3				
21-01-2014	8	4	3	3	3																													78	25	6	6	5				
22-01-2014	7	0	3	3	3	3	1	0	0	0	2	0	2	2	2	2	0	2	2	2														79	16	7	7	7				
23-01-2014	11	2	6	6	5	2	0	0	0	0	4	1	4	4	3	2	0	2	2	2														94	16	12	12	10				
24-01-2014	4	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0	0	0	0	6	1	3	3	3	3	0	3	3	3									75	7	9	9	9				
27-01-2014	7	1	3	3	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	3	3	3	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87	11	7	7	6
28-01-2014	8	0	3	3	3	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0	4	4	4	4	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	69	8	10	10	10	
29-01-2014	6	0	3	3	2	6	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	2	4	4	4	2	0	2	2	1	3	0	3	3	1	0	0	0	0	0	87	9	12	12	8		
30-01-2014	10	0	3	3	2	5	0	0	0	0	3	1	0	0	0	4	2	0	0	0	2	0	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	98	22	6	6	4			
31-01-2014	6	3	3	3	3	3	1	0	0	0	2	1	0	0	0	6	4	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93	45	9	9	9				
TOTAL	75	12	30	30	26	27	2	0	0	0	22	3	6	6	5	31	9	24	24	24	12	0	11	11	9	4	1	4	4	2	0	1	0	0	0	1412	353	203	187	149		

Legenda:

TT	UFC totais típicas;	T A	UFC totais atípicas;	C	Nº colónias confirmadas;
BC	Nº bactérias coliformes confirmadas;	EC	Nº <i>E. Coli.</i> confirmadas.		



### A.3 Estreptomicina (baixas concentrações)

*Tabela 13 - Análises efetuadas em meio LSA com estreptomicina (Baixas Concentrações).*

DATA	LSA +Estreptomicina																																				
	Aliquotas analisadas	Aliquotas confirmadas	Concentração (mg/L)																																		
			2					4					6					8					12					16					24				
			TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC					
12-12-2013	12	8	51	4	9	9	6	41	0	10	10	7																									
17-12-2013	16	9	102	53	6	5	0	107	34	6	6	0	27	11	5	5	0	43	71	6	5	0															
18-12-2013	10	6	76	47	6	6	0	42	71	3	1	0	35	57	3	3	0	53	92	6	5	0															
19-12-2013	20	0	100	49	0	0	0	107	71	0	0	0	86	26	0	0	0	98	21	0	0	0	154	28	0	0	0	#	78	0	0	0					
26-12-2013	12	1																				28	8	0	0	0	10	4	0	0	0	17	8	0	0	0	
02-01-2014	8	1																																			
06-01-2014	7	1																																			
07-01-2014	8	1																																			
TOTAL	93	27	329	153	21	20	6	297	176	19	17	7	148	94	8	8	0	194	184	12	10	0	182	36	0	0	0	177	82	0	0	0	17	8	0	0	0

DATA	LSA +Estreptomicina																								TOTAL																				
	Concentração (mg/L)																																												
	32					40					48					56					70									90					110					130					
	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC										
12/12/2013																																									92	4	19	19	13
17/12/2013																																									279	169	23	21	0
18/12/2013																																									206	267	18	15	0
19/12/2013																																									712	273	0	0	0
26/12/2013	10	3	3	3	2	55	15	0	0	0	44	16	0	0	0																					164	54	3	3	2					
02/01/2014	7	3	0	0	0	5	2	0	0	0	11	4	0	0	0	6	1	3	3	2																					29	10	3	3	2
06/01/2014																16	2	0	0	0	13	2	0	0	0	8	10	0	0	0	9	1	0	0	0	10	5	0	0	0	56	20	0	0	0
07/01/2014																					20	8	0	0	0	14	9	0	0	0	10	5	0	0	0	8	2	0	0	0	52	24	0	0	0
TOTAL	17	6	3	3	2	60	17	0	0	0	55	20	0	0	0	22	3	3	3	2	33	10	0	0	0	22	19	0	0	0	19	6	0	0	0	18	7	0	0	0	1590	821	66	61	17

**Legenda:**

TT UFC totais típicas;

TA UFC totais atípicas;

C Nº colónias confirmadas;

BC Nº bactérias coliformes confirmadas;

EC Nº *E. Coli.* confirmadas.



## A.4 Estreptomicina (Altas concentrações)

Tabela 14 - Análises efetuadas em meio LSA com estreptomicina (Altas Concentrações).

DATA	LSA + Estreptomicina																										
	Amostras Realizadas	Amostras Confirmadas	Concentração (mg/L)																								
			150					200					250					300					400				
			TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	B C	EC	TT	TA	C	B C	E C	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC
07-01-2014	8	1	8	1	0	0	0	5	2	0	0	0	3	1	0	0	0	7	4	3	3	3					
08-01-2014	10	2	1	1	0	0	0	9	1	0	0	0	18	3	0	0	0	7	2	6	6	5					
09-01-2014	14	2	13	6	0	0	0	18	8	0	0	0	8	5	0	0	0	11	1	6	5	4	4	1	0	0	0
10-01-2014	17	4						85	50	0	0	0	77	34	3	2	2	86	56	0	0	0	77	32	3	0	0
13-01-2014	9	3						4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	3	3	3	0	0	0	0	0
14-01-2014	7	1						1	7	0	0	0	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
15-01-2014	7	1						0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0
16-01-2014	7	1											0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
17-01-2014	5	2											44	5	0	0	0	27	7	0	0	0	15	5	0	0	0
20-01-2014	5	1											38	14	0	0	0	35	10	0	0	0	20	9	0	0	0
21-01-2014	6	3											42	14	0	0	0	31	21	3	3	2	8	29	0	0	0
22-01-2014	9	3											24	42	0	0	0	18	26	3	3	2	9	35	0	0	0
23-01-2014	13	7											31	5	0	0	0	26	18	6	6	5	2	2	0	0	0
24-01-2014	9	4											6	3	0	0	0	15	2	3	3	2	7	0	0	0	0
27-01-2014	10	4											32	24	0	0	0	31	4	3	3	2	1	10	0	0	0
28-01-2014	11	5											15	2	0	0	0	26	13	3	3	2	8	12	0	0	0
29-01-2014	12	6											11	3	0	0	0	5	1	3	3	2	2	7	0	0	0
30-01-2014	11	7																5	7	3	3	2	3	12	0	0	0
31-01-2014	12	5																24	3	0	0	0	23	34	0	0	0
TOTAL	174	61	22	8	0	0	0	122	68	0	0	0	355	157	3	2	2	361	176	47	46	35	181	189	3	0	0

(continuação)

DATA	LSA + Estreptomicina																								
	Concentração (mg/L)																								
	500					600					700					800					900				
	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC	TT	TA	C	BC	EC
07-01-2014																									
08-01-2014																									
09-01-2014	0	0	0	0	0																				
10-01-2014	29	17	4	1	0																				
13-01-2014	0	0	0	0	0	9	3	6	1	1															
14-01-2014	0	1	0	0	0	9	5	3	0	0															
15-01-2014	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0															
16-01-2014	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0															
17-01-2014	10	3	3	0	0	7	2	3	1	0															
20-01-2014	15	10	0	0	0	10	7	3	1	1															
21-01-2014	4	3	0	0	0	4	2	3	1	0	2	0	2	2	0										
22-01-2014	2	14	2	1	0	3	6	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23-01-2014	3	1	3	2	2	4	4	4	2	1	0	3	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
24-01-2014	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
27-01-2014	6	2	3	2	1	2	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28-01-2014	2	0	0	0	0	12	4	6	6	2	3	4	3	3	0	0	3	0	0	0	1	0	1	1	0
29-01-2014	4	2	4	2	0	3	2	3	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30-01-2014	7	15	6	6	2	4	9	4	1	1	2	3	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
31-01-2014	12	15	0	0	0	2	3	2	2	1	6	7	6	4	1	2	0	2	0	0	1	0	1	0	0
TOTAL	98	84	28	15	5	71	48	44	18	8	15	18	13	10	1	5	3	5	3	0	3	0	3	2	0

Legenda:

TT UFC totais típicas; TA UFC totais atípicas; C Nº colónias confirmadas; BC Nº bactérias coliformes confirmadas; EC Nº *E. Coli.* confirmadas.

## Anexo B - Precipitação e Turvação

*Tabela 15 - Valores diários de Precipitação e Turvação da amostra.*

Data	Precipitação (mm)	Turvação (NTU)
01-12-2013	0	-
02-12-2013	0	-
03-12-2013	0	-
04-12-2013	0	5
05-12-2013	0	-
06-12-2013	0	-
07-12-2013	0	-
08-12-2013	0	-
09-12-2013	0	-
10-12-2013	0	-
11-12-2013	0	2,2
12-12-2013	0	-
13-12-2013	47	-
14-12-2013	1	-
15-12-2013	0	-
16-12-2013	0	-
17-12-2013	3,5	-
18-12-2013	13,5	3,2
19-12-2013	71	-
20-12-2013	0	-
21-12-2013	0	-
22-12-2013	1,5	-
23-12-2013	1	-
24-12-2013	15	-
25-12-2013	20	-
26-12-2013	15	11
27-12-2013	34,2	13
28-12-2013	7	-
29-12-2013	1	-
30-12-2013	9,1	14
31-12-2013	15,4	8
01-01-2014	28,3	7
02-01-2014	48,8	10
03-01-2014	24,3	24
04-01-2014	32,9	10
05-01-2014	2,2	9
06-01-2014	21,8	13
07-01-2014	1,5	12
08-01-2014	0,2	12
09-01-2014	0	12
10-01-2014	0	12
11-01-2014	0	7
12-01-2014	9,63	5
13-01-2014	15,7	7
14-01-2014	14	6
15-01-2014	17,4	8
16-01-2014	22	5
17-01-2014	12	6
18-01-2014	14,2	4,7
19-01-2014	5,8	6
20-01-2014	1,2	8
21-01-2014	6,7	9
22-01-2014	5,7	10
23-01-2014	0,1	10
24-01-2014	0,3	9
25-01-2014	1,1	9
26-01-2014	3,2	9
27-01-2014	0,5	8
28-01-2014	1,5	8
29-01-2014	1,2	11
30-01-2014	3	9
31-01-2014	4	8

## Anexo C - Tabelas de Resultados

### C.1. Ciprofloxacina

Tabela 16 - UFC para todas as análises efetuadas com ciprofloxacina.

DATA	Determinação	LSA	LSA + Ciprofloxacina														
			Concentração (mg/L)														
			2	4	6	8	12	16	20	30	40	60	80	100	120	150	200
12-12-2013	CT	299	6	4													
	Coliformes	114	4	4													
	E. coli	61	3	3													
17-12-2013	CT	190	15	9	2	0											
	Coliformes	80	9	5	2	0											
	E. coli	27	4	3	2	0											
18-12-2013	CT	62	12	4	8	5											
	Coliformes	46	3	2	0	2											
	E. coli	31	0	1	0	1											
19-12-2013	CT	230	38	16	22	2											
	Coliformes	150	17	4	8	2											
	E. coli	50	12	1	3	2											
26-12-2013	CT	1140	122	108	108												
	Coliformes	273	84	72	66	NDTR											
	E. coli	91	56	48	66												
02-01-2014	CT	660			0	30											
	Coliformes	480			0	30											
	E. coli	160			0	20											
06-01-2014	CT	3400			50	40											
	Coliformes	2800			50	30											
	E. coli	933			50	30											
07-01-2014	CT	3500			60	40											
	Coliformes	3000			33	30											
	E. coli	1000			22	30											
08-01-2014	CT	1100			50	10											
	Coliformes	800			40	10											
	E. coli	533			27	10											
09-01-2014	CT	2400			30	30	40										
	Coliformes	1900			20	30	NE										
	E. coli	633			7	20											
10-01-2014	CT	2140			30	30	30										
	Coliformes	1800			30	30	20										
	E. coli	600			0	20	10										
13-01-2014	CT	860			20	20	30	11									
	Coliformes	700			20	20	30	10									
	E. coli	233			10	10	30	10									
14-01-2014	CT	1000			70	10	<10	26	12								
	Coliformes	700			70	10	<10	20									
	E. coli	467			23	10	10	NE									
15-01-2014	CT	590			20	<10	10	10	6	6							
	Coliformes	520			NE	<10	NE	NE	NE	4							
	E. coli	173					NE	NE	NE	3							
16-01-2014	CT	590			20	10	40	5	15								
	Coliformes	307			NE	NE	<10	NE	3	15							
	E. coli	204					NE	2	15								
17-01-2014	CT	1000			30	23	20	21	3								
	Coliformes	700			NDRT	NE	21	NE	18	3							
	E. coli	467				18	NE	18	3								
20-01-2014	CT	900			59	29	20	17	13	27	10						
	Coliformes	700			NE	NE	15	NE	NE	NE	8						
	E. coli	467				12		NE	NE	NE	8						
21-01-2014	CT	1600			30	21	9	9	18	4	12						
	Coliformes	1400			NE	NE	NE	NE	NE	4	8						
	E. coli	467					NE	NE	NE	3	5						
22-01-2014	CT	910			27	11	10	11	10	10	7	4	2	2			
	Coliformes	810			NE	NE	NE	NE	NE	NE	7	3	2	2			
	E. coli	540									7	3	2	2			
23-01-2014	CT	310			46	9	5	8	15	5	7	2	3	1			
	Coliformes	150			NE	NE	4	NE	NE	NE	6	2	2	1			
	E. coli	150					4				5	2	2	1			
24-01-2014	CT	400			24	12	7	5	4	10	4	3	4	2	2		
	Coliformes	270			NE	NE	NE	5	4	NE	NE	NE	NE	2	2		
	E. coli	180						5	4					2	2		
27-01-2014	CT	700			31	10	17	12	8	4	8	3	1	2	1	0	0
	Coliformes	600			NE	NE	NE	NE	NE	NE	7	3	NE	2	1	0	0
	E. coli	400					NE	NE	NE	NE	5	2		2	1	0	0
28-01-2014	CT	800			15	12	8	7	11	4	8	2	3	2	2	0	0
	Coliformes	600			NE	NE	8	7	NE	NE	8	2		2	2	0	0
	E. coli	267					8	6			8	2	NE	2	2	0	0
29-01-2014	CT	610			19	17	6	7	12	6	6	6	3	3	1	2	0
	Coliformes	390			NE	NE	6	7		NE	6	6		2	1	1	0
	E. coli	130					4	4			4	3	NE	1	1	1	0
30-01-2014	CT	1000			35	17	8		16	15	10	5	4	6	1	1	0
	Coliformes	900			NE	NE	8	NDTR		NE	10	5		NE	1	1	0
	E. coli	600					6				7	3	NE		1	1	0
31-01-2014	CT	1120			61	12	9	16	7	7	9	4	3	5	0	0	0
	Coliformes	700			NE	NE	NE	NE	NE	NE	6	3		3	0	0	0
	E. coli	467					NE	NE	NE	NE	6	3	NE	3	0	0	0

Legenda: NE Não efetuada confirmação da placa; CT UFC totais

<10 Volume inferior a 100 ml. com ausência de crescimentos;

NDTR Não Determinado por motivos de ordem técnica;

NOTA: A azul são apresentados os valores de UFC obtidos em duplicado.

**Tabela 17 - Proporção de bactérias coliformes e *E. coli* relativamente às bactérias totais para diferentes concentrações de ciprofloxacina.**

DATA	Percentagem %	LSA	LSA + Ciprofloxacina														
			Concentração (mg/L)														
			2	4	6	8	12	16	20	30	40	60	80	100	120	150	200
12-12-2013	BC/CT	38	67	100													
	EC/BC	54	75	75													
	EC/CT	20	50	75													
17-12-2013	BC/CT	42	60	56	100	0											
	EC/BC	33	44	60	100	0											
	EC/CT	14	27	33	100	0											
18-12-2013	BC/CT	74	22	50	0	40											
	EC/BC	67	0	50	0	33											
	EC/CT	49	0	25	0	13											
19-12-2013	BC/CT	65	46	25	36	100											
	EC/BC	33	67	33	33	100											
	EC/CT	22	30	8	12	100											
26-12-2013	BC/CT	24	69	67	61												
	EC/BC	33	67	67	100	NDRT											
	EC/CT	8	46	44	61												
02-01-2014	BC/CT	73			0	100											
	EC/BC	33			0	67											
	EC/CT	24			0	67											
06-01-2014	BC/CT	82			100	75											
	EC/BC	33			100	100											
	EC/CT	27			100	75											
07-01-2014	BC/CT	86			55	75											
	EC/BC	33			37	75											
	EC/CT	29			37	75											
08-01-2014	BC/CT	73			80	100											
	EC/BC	67			67	100											
	EC/CT	48			53	100											
09-01-2014	BC/CT	79			67	100											
	EC/BC	33			33	67	NE										
	EC/CT	26			22	67											
10-01-2014	BC/CT	84			100	100	67										
	EC/BC	33			0	67	50										
	EC/CT	28			0	67	33										
13-01-2014	BC/CT	81			100	100	100	91									
	EC/BC	33			50	50	100	100									
	EC/CT	27			50	50	100	91									
14-01-2014	BC/CT	70			100	100	77										
	EC/BC	67			33	100	NE	50	NE								
	EC/CT	47			33	100	38										
15-01-2014	BC/CT	88								67							
	EC/BC	33			NE	NE	NE	NE	NE	75							
	EC/CT	29								50							
16-01-2014	BC/CT	52								60	100						
	EC/BC	66			NE	NE	NE	NE		67	100						
	EC/CT	35								40	100						
17-01-2014	BC/CT	70					91			86	100						
	EC/BC	67			NDRT	NE	86	NE		100	100						
	EC/CT	47					78			86	100						
20-01-2014	BC/CT	78					75					80					
	EC/BC	67			NE	NE	80	NE		NE	NE	100					
	EC/CT	52					60					80					
21-01-2014	BC/CT	88									100	67					
	EC/BC	33			NE	NE	NE	NE		NE	75	63					
	EC/CT	29									75	42					
22-01-2014	BC/CT	89									100	75	100	100			
	EC/BC	67			NE	NE	NE	NE		NE	100	100	100	100			
	EC/CT	59									100	75	100	100			
23-01-2014	BC/CT	48					80				86	100	67	100			
	EC/BC	100			NE	NE	0	NE		NE	83	100	100	100			
	EC/CT	48					0				71	100	67	100			
24-01-2014	BC/CT	68						100	100					100	100		
	EC/BC	67			NE	NE	NE	100	100	NE	NE	NE	NE	100	100		
	EC/CT	45						100	100					100	100		
27-01-2014	BC/CT	86										88	100	100	100	0	0
	EC/BC	67			NE	NE	NE	NE		NE	NE	71	67	NE	100	100	0
	EC/CT	57										63	67		100	100	0
28-01-2014	BC/CT	75					100	100			100	100		100	100	0	0
	EC/BC	45			NE	NE	100	86	NE		100	100	NE	100	100	0	0
	EC/CT	33					100	86			100	100		100	100	0	0
29-01-2014	BC/CT	64					100	100			100	100		67	100	50	0
	EC/BC	33			NE	NE	67	57	NE		NE	67	50	NE	50	100	100
	EC/CT	21					67	57				67	50		33	100	50
30-01-2014	BC/CT	90					100				100	100			100	100	0
	EC/BC	67			NE	NE	75	NE		NE	NE	70	60	NE	NE	100	100
	EC/CT	60					75					70	60			100	100
31-01-2014	BC/CT	63									67	75		60	0	0	0
	EC/BC	67			NE	NE	NE	NE		NE	NE	100	100	NE	100	0	0
	EC/CT	42										67	75		60	0	0
Média	BC/BT	67,7	48,9	54,1	76,1	86,1	88,2	93,1	80,1	90,4	86,3	92,1	81,6	87,7	100	70,7	0,0
	EC/BC	47,4	62,0	54,9	54,9	71,9	78,2	75,5	87,4	86,6	84,0	83,3	100,0	90,6	100	100,0	0,0
	EC/BT	32,5	36,9	29,7	43,3	63,8	68,6	70,3	70,0	78,3	71,1	73,2	81,6	79,5	100	70,7	0,0

Legenda:

NE  
CTNão efetuada confirmação da placa;  
UFC totais;NDTR  
BCNão Determinado por motivos de ordem técnica;  
Bactérias Coliformes.

EC

*Escherichia coli*;

**Tabela 18 - Valores de prevalência para diferentes concentrações de ciprofloxacina.**

DATA	Taxa de Prevalência (%)	LSA + Ciprofloxacina														
		Concentração (µg/mL)														
		2	4	6	8	12	16	20	30	40	60	80	100	120	150	200
12-12-2013	CT	2,0	1,3													
	Coliformes	3,5	3,5													
	<i>E. coli</i>	4,9	4,9													
17-12-2013	CT	7,9	4,7	1,1	0,0											
	Coliformes	11,3	6,3	2,5	0,0											
	<i>E. coli</i>	15,0	11,3	7,5	0,0											
18-12-2013	CT	19,4	6,5	12,9	8,1											
	Coliformes	5,8	4,3	0,0	4,3											
	<i>E. coli</i>	0,0	3,3	0,0	2,2											
19-12-2013	CT	16,5	7,0	9,6	0,9											
	Coliformes	11,6	2,7	5,3	1,3											
	<i>E. coli</i>	23,1	2,7	5,3	4,0											
26-12-2013	CT	10,7	9,5	9,5												
	Coliformes	30,7	26,3	24,1	NDTR											
	<i>E. coli</i>	61,5	52,7	72,4												
02-01-2014	CT			0,0	4,5											
	Coliformes			0,0	6,3											
	<i>E. coli</i>			0,0	12,5											
06-01-2014	CT			1,5	1,2											
	Coliformes			1,8	1,1											
	<i>E. coli</i>			5,4	3,2											
07-01-2014	CT			1,7	1,1											
	Coliformes			1,1	1,0											
	<i>E. coli</i>			2,2	3,0											
08-01-2014	CT			4,5	0,9											
	Coliformes			5,0	1,3											
	<i>E. coli</i>			5,0	1,9											
09-01-2014	CT			1,3	1,3	1,7										
	Coliformes			1,1	1,6	NE										
	<i>E. coli</i>			1,1	3,2											
10-01-2014	CT			1,4	1,4	1,4										
	Coliformes			1,7	1,7	1,1										
	<i>E. coli</i>			0,0	3,3	1,7										
13-01-2014	CT			2,3	2,3	3,5	1,3									
	Coliformes			2,9	2,9	4,3	1,4									
	<i>E. coli</i>			4,3	4,3	12,9	4,3									
14-01-2014	CT			7,0	1,0		2,6	1,2								
	Coliformes			10,0	1,4	NE	2,9	NE								
	<i>E. coli</i>			4,9	2,1		2,1									
15-01-2014	CT			3,4		1,7	1,7	1,0	1,0							
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	NE	0,8							
	<i>E. coli</i>								1,7							
16-01-2014	CT			3,4	1,7		6,8	0,8	2,5							
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	1,0	4,9							
	<i>E. coli</i>							1,0	7,4							
17-01-2014	CT			NDTR	3,0	2,3	2,0	2,1	0,3							
	Coliformes			NE	3,0	3,0	NE	2,6	0,4							
	<i>E. coli</i>				3,9	3,9		3,9	0,6							
20-01-2014	CT			6,6	3,2	2,2	1,9	1,4	3,0	1,1						
	Coliformes			NE	NE	2,1	NE	NE	NE	1,1						
	<i>E. coli</i>					2,6				1,7						
21-01-2014	CT			1,9	1,3	0,6	0,6	1,1	0,2	0,7						
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	NE	0,3	0,6						
	<i>E. coli</i>								0,6	1,1						
22-01-2014	CT			3,0	1,2	1,1	1,2	1,1	0,8	0,4	0,2	0,2				
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	NE	0,9	0,4	0,2	0,2				
	<i>E. coli</i>								1,3	0,6	0,4	0,4				
23-01-2014	CT			14,8	2,9	1,6	2,6	4,8	1,6	2,3	0,6	1,0	0,3			
	Coliformes			NE	NE	2,7	NE	NE	NE	4,0	1,3	1,3	0,7			
	<i>E. coli</i>					2,7				3,3	1,3	1,3	0,7			
24-01-2014	CT			6,0	3,0	1,8	1,3	1,0	2,5	1,0	0,7	1,0	0,5	0,5		
	Coliformes			NE	NE	NE	1,9	1,5		NE	NE	NE	0,7	0,7		
	<i>E. coli</i>						2,8	2,2					1,1	1,1		
27-01-2014	CT			4,4	1,4	2,4	1,7	1,1	0,6	1,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,0	0,0
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	NE	NE	1,2	0,5	NE	0,3	0,2	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>									1,3	0,5		0,5	0,2	0,0	0,0
28-01-2014	CT			1,9	1,5	1,0	0,9	1,4	0,5	1,0	0,2	0,4	0,2	0,2	0,0	0,0
	Coliformes			NE	NE	1,3	1,2	NE	NE	1,3	0,3	NE	0,3	0,3	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>					3,0	2,2			3,0	0,7		0,7	0,7	0,0	0,0
29-01-2014	CT			3,1	2,8	1,0	1,1	2,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,2	0,3	0,0	0,0
	Coliformes			NE	NE		1,5	1,8	NE	1,5	1,5	NE	0,5	0,3	0,3	0,0
	<i>E. coli</i>					3,1	3,1			3,1	2,3		0,8	0,8	0,8	0,0
30-01-2014	CT			3,5	1,7	0,8		1,6	1,5	1,0	0,5	0,4	0,6	0,1	0,1	0,0
	Coliformes			NE	NE	0,9	NE	NE	NE	1,1	0,6	NE	NE	0,1	0,1	0,0
	<i>E. coli</i>					1,0				1,2	0,5			0,2	0,2	0,0
31-01-2014	CT			5,4	1,1	0,8	1,4	0,6	0,6	0,8	0,4	0,3	0,4	0,0	0,0	0,0
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,9	0,4	NE	0,4	0,0	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>									1,3	0,6		0,6	0,0	0,0	0,0

**Legenda:**

NE Não efetuada confirmação da placa; 
 <10 Volume inferior a 100 mL com ausência de crescimentos; 
 NDTR Não Determinado por motivos de ordem técnica; 
 CT UFC totais

**NOTA:** A azul são apresentados os valores de UFC obtidos em duplicado.

## C.2. Estreptomicina (Baixas concentrações)

**Tabela 19 - UFC para todas as análises efetuadas com estreptomicina (Baixas Concentrações).**

DATA	Determinação	LSA	LSA + Estreptomicina														
			Concentração (mg/L)														
			2	4	6	8	12	16	24	32	40	48	56	70	90	110	130
12-12-2013	CT	114	25	19													
	Coliformes	114	25	19													
	<i>E. coli</i>	61	21	15													
17-12-2013	CT	80	62	54	13	29											
	Coliformes	80	NE	NE	NE	NE											
	<i>E. coli</i>	27															
18-12-2013	CT	46	53	26	18	18											
	Coliformes	46	NE	NE	NE	NE											
	<i>E. coli</i>	31															
19-12-2013	CT	150	60	50	60	58	42	49									
	Coliformes	150	NE	NE	NE	NE	NE	NE									
	<i>E. coli</i>	50															
26-12-2013	CT	820					280	100	170	100	110	88					
	Coliformes	273					NE	NE	NE	100	NE	NE	NDRT				
	<i>E. coli</i>	91								67							
02-01-2014	CT	480								60	50	100	60				
	Coliformes	480								NE	NE	NE	60				
	<i>E. coli</i>	160											40				
06-01-2014	CT	2800											140	130	80	90	100
	Coliformes	2800											NE	NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i>	933															
07-01-2014	CT	3000												200	140	100	80
	Coliformes	3000												NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i>	1000															

Legenda:  
 NE Não efetuada confirmação da placa; <10 Volume inferior a 100 mL com ausência de crescimentos; NDTR Não Determinado por motivos de ordem técnica;  
 CT UFC totais  
 NOTA: A azul são apresentados os valores de UFC obtidos em duplicado.

**Tabela 20 - Proporção de bactérias coliformes e *E. coli* relativamente às bactérias totais para diferentes concentrações de estreptomicina (Baixas Concentrações).**

DATA	Percentagem %	LSA	LSA + Estreptomicina														
			Concentração (µg/mL)														
			2	4	6	8	12	16	24	32	40	48	56	70	90	110	130
12-12-2013	BC/CT	100	100	100													
	EC/BC	54	84	79													
	EC/CT	54	84	79													
17-12-2013	BC/CT	100	NE	NE	NE	NE											
	EC/BC	33															
	EC/CT	33															
18-12-2013	BC/CT	100	NE	NE	NE	NE											
	EC/BC	67															
	EC/CT	67															
19-12-2013	BC/CT	100	NE	NE	NE	NE	NE	NE									
	EC/BC	33															
	EC/CT	33															
26-12-2013	BC/CT	33					NE	NE	NE	100	NE	NE	NDTR				
	EC/BC	33								67	NE	NE					
	EC/CT	11								67							
02-01-2014	BC/CT	100											100				
	EC/BC	33								NE	NE	NE	67				
	EC/CT	33											67				
06-01-2014	BC/CT	100											NE	NE	NE	NE	NE
	EC/BC	33															
	EC/CT	33															
07-01-2014	BC/CT	100															
	EC/BC	33												NE	NE	NE	NE
	EC/CT	33															

Legenda:  
 NE Não efetuada confirmação da placa; NDTR Não Determinado por motivos de ordem técnica; EC *Escherichia coli*;  
 CT UFC totais BC Bactérias Coliformes.



**Tabela 21 - Valores de prevalência para diferentes concentrações de estreptomicina (Baixas Concentrações).**

DATA	Taxa de Prevalência (%)	LSA + Estreptomicina														
		Concentração (mg/L)														
		2	4	6	8	12	16	24	32	40	48	56	70	90	110	130
12-12-2013	CT	21,9	16,7													
	Coliformes	21,9	16,7													
	<i>E. coli</i>	34,4	24,6													
17-12-2013	CT	77,5	67,5	16,3	36,3											
	Coliformes	NE	NE	NE	NE											
	<i>E. coli</i>															
18-12-2013	CT		56,5	39,1	39,1											
	Coliformes	NE	NE	NE	NE											
	<i>E. coli</i>															
19-12-2013	CT	40,0	33,3	40,0	38,7	28,0	32,7									
	Coliformes	NE	NE	NE	NE	NE	NE									
	<i>E. coli</i>															
26-12-2013	CT					34,1	12,2	20,7	12,2	13,4	10,7					
	Coliformes					NE	NE	NE	36,6	NE	NE	NDTR				
	<i>E. coli</i>								73,5							
02-01-2014	CT								12,5	10,4	20,8	12,5				
	Coliformes								NE	NE	NE	12,5				
	<i>E. coli</i>											25,0				
06-01-2014	CT											5,0	4,6	2,9	3,2	3,6
	Coliformes											NE	NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i>															
07-01-2014	CT												6,7	4,7	3,3	2,7
	Coliformes												NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i>															

Legenda:



Não efetuada confirmação da placa;

NDTR

Não Determinado por motivos de ordem técnica.

### C.3. Estreptomicina (Altas Concentrações)

Tabela 22 - - UFC para todas as análises efetuadas com estreptomicina (Altas Concentrações).

DATA	Determinação	LSA	LSA + Estreptomicina										
			Concentração (mg/L)										
			150	200	250	300	400	500	600	700	800	900	1000
07-01-2014	CT	3500	90	70	40	110							
	Coliformes	3000	NE	NE	NE	70							
	<i>E. coli</i>	1000				70							
08-01-2014	CT	1100	15	55	105	45							
	Coliformes	800	NE	NE	NE	35							
	<i>E. coli</i>	533				28							
09-01-2014	CT	2400	110	120	65	60	25						
	Coliformes	1900	NE	NE	NE	45	NE	<10					
	<i>E. coli</i>	633				37							
10-01-2014	CT	2140		94	114	92	61	7					
	Coliformes	1800		NE	53	NE	0	10					
	<i>E. coli</i>	600			36		0	0					
13-01-2014	CT	860		40	20	40			8				
	Coliformes	700		NE	NE	40	<10	<10	2				
	<i>E. coli</i>	233				40			1				
14-01-2014	CT	1000		80	50	10	20		13				
	Coliformes	700		NE	NE	NE	NE	<10	0				
	<i>E. coli</i>	467							0				
15-01-2014	CT	590			10	30			2				
	Coliformes	520		<10	NE	NE	<10	<10	0				
	<i>E. coli</i>	173							0				
16-01-2014	CT	590					10	3	0				
	Coliformes	307			<10	<10	NE	NE	0				
	<i>E. coli</i>	204							0				
17-01-2014	CT	1000			49	34	20	13	9				
	Coliformes	700			NE	NE	NE	0	2				
	<i>E. coli</i>	467						0	0				
20-01-2014	CT	900			52	45	29	25	17				
	Coliformes	700			NE	NE	NE	NE	3				
	<i>E. coli</i>	467							3				
21-01-2014	CT	1600			56	52	37	7	6	2			
	Coliformes	1400			NE	31	NE	NE	1	2			
	<i>E. coli</i>	467				21			0	0			
22-01-2014	CT	910			66	44	44	16	9	0	0	0	0
	Coliformes	810			24	18	NE	1	1	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	540			44	12		0	0	0	0	0	0
23-01-2014	CT	310			36	22	4	3	4	3	1	0	0
	Coliformes	150			31	13	2	2	1	0	1	0	0
	<i>E. coli</i>	150			16	11	1	1	0	0	0	0	0
24-01-2014	CT	400			9	17	7	2	0	1	1	1	0
	Coliformes	270			NE	15	5	NE	NE	0	1	1	0
	<i>E. coli</i>	180				10	3			0	0	0	0
27-01-2014	CT	700			56	35	11	8	2	0	0	0	0
	Coliformes	600			32	31	NE	4	1	0	0	0	0
	<i>E. coli</i>	400			25	21		2	1	0	0	0	0
28-01-2014	CT	800			17	39	20	2	8	4	3	1	0
	Coliformes	600			NE	26	8	NE	6	2	0	1	0
	<i>E. coli</i>	267				17	4		2	0	0	0	0
29-01-2014	CT	610			14	6	9	3	3	1	0	0	0
	Coliformes	390			11	5	NE	1	1	1	0	0	0
	<i>E. coli</i>	130			8	3		0	0	0	0	0	0
30-01-2014	CT	1000			0	12	15	12	7	3	1	0	0
	Coliformes	900				5	NE	4	1	1	1	0	0
	<i>E. coli</i>	600				3		1	1	1	0	0	0
31-01-2014	CT	1120			0	27	42	14	5	7	2	1	0
	Coliformes	700				NE	6	NE	2	2	0	0	0
	<i>E. coli</i>	467					4		1	0	0	0	0

Legenda:

NE	Não efetuada confirmação da placa;	<10	Volume inferior a 100 mL com ausência de crescimentos;	NDTR	Não Determinado por motivos de ordem técnica;
CT	UFC totais	NOTA:	A azul são apresentados os valores de UFC obtidos em duplicado.		

**Tabela 23 - Proporção de bactérias coliformes e *E. coli* relativamente às bactérias totais para diferentes concentrações de estreptomicina (Altas Concentrações)**

DATA	Percentagem %	LSA	LSA + Estreptomicina										
			Concentração (mg/L)										
			150	200	250	300	400	500	600	700	800	900	1000
07-01-2014	BC/CT	86				64							
	EC/BC	33	NE	NE	NE	100							
	EC/CT	29				64							
08-01-2014	BC/CT	73				78							
	EC/BC	67	NE	NE	NE	80							
	EC/CT	48				62							
09-01-2014	BC/CT	79				75							
	EC/BC	33	NE	NE	NE	82	NE	NE					
	EC/CT	26				62							
10-01-2014	BC/CT	84			46		0	143					
	EC/BC	33		NE	68	NE	0	0					
	EC/CT	28			32		0	0					
13-01-2014	BC/CT	81				100			25				
	EC/BC	33		NE	NE	100	NE	NE	50				
	EC/CT	27				100			13				
14-01-2014	BC/CT	70							0				
	EC/BC	67		NE	NE	NE	NE	NE	0				
	EC/CT	47							0				
15-01-2014	BC/CT	88							0				
	EC/BC	33		NE	NE	NE	NE	NE	0				
	EC/CT	29							0				
16-01-2014	BC/CT	52							0				
	EC/BC	66			NE	NE	NE	NE	0				
	EC/CT	35							0				
17-01-2014	BC/CT	70						0	22				
	EC/BC	67			NE	NE	NE	0	0				
	EC/CT	47						0	0				
20-01-2014	BC/CT	78							18				
	EC/BC	67			NE	NE	NE	NE	100				
	EC/CT	52							18				
21-01-2014	BC/CT	88				60			17	100			
	EC/BC	33			NE	68	NE	NE	0	0			
	EC/CT	29				40			0	0			
22-01-2014	BC/CT	89			36	41		6	11	0	0	0	0
	EC/BC	67			182	67	NE	0	0	0	0	0	0
	EC/CT	59			66	27		0	0	0	0	0	0
23-01-2014	BC/CT	48			86	59	50	67	25	0	100	0	0
	EC/BC	100			50	85	50	50	0	0	0	0	0
	EC/CT	48			43	50	25	33	0	0	0	0	0
24-01-2014	BC/CT	68				88	71		0	100	100	0	0
	EC/BC	67			NE	67	60	NE	0	0	0	0	0
	EC/CT	45				59	43		0	0	0	0	0
27-01-2014	BC/CT	86			57	89		50	50	0	0	0	0
	EC/BC	67			78	68	NE	50	100	0	0	0	0
	EC/CT	57			45	60		25	50	0	0	0	0
28-01-2014	BC/CT	75				67	40		75	50	0	100	0
	EC/BC	45			NE	65	50	NE	33	0	0	0	0
	EC/CT	33				44	20		25	0	0	0	0
29-01-2014	BC/CT	64			79	83		33	33	100	0	0	0
	EC/BC	33			73	60	NE	0	0	0	0	0	0
	EC/CT	21			57	50		0	0	0	0	0	0
30-01-2014	BC/CT	90				42		33	14	33	100	0	0
	EC/BC	67				60	NE	25	100	100	0	0	0
	EC/CT	60				25		8	14	33	0	0	0
31-01-2014	BC/CT	63					14		40	29	0	0	0
	EC/BC	67				NE	67	NE	50	0	0	0	0
	EC/CT	42					10		20	0	0	0	0
Média	BC/CT	74			61	70	38	39	26	62	100,0	100,0	100,0
	EC/BC	52			90	75	56	40	66	20	0,0	0,0	0,0
	EC/CT	38			49	54	21	19	21	7	0,0	0,0	0,0

Legenda:

NE Não efetuada confirmação da placa; NDTR Não Determinado por motivos de ordem técnica; EC *Escherichia coli*;  
CT UFC totais BC Bactérias Coliformes.

**Tabela 24 - Valores de prevalência para diferentes concentrações de estreptomicina (Altas Concentrações)**

DATA	Taxa de Prevalência (%)	LSA + Estreptomicina										
		Concentração (mg/L)										
		150	200	250	300	400	500	600	700	800	900	1000
07-01-2014	CT	2,6	2,0	1,1	3,1							
	Coliformes	NE	NE	NE	2,3							
	<i>E. coli</i>				7,0							
08-01-2014	CT	1,4	5,0	9,5	4,1							
	Coliformes	NE	NE	NE	4,4							
	<i>E. coli</i>				5,3							
09-01-2014	CT	4,6	5,0	2,7	2,5	1,0						
	Coliformes	NE	NE	NE	2,4	NE	NE					
	<i>E. coli</i>				5,8							
10-01-2014	CT		4,4	5,3	4,3	2,9	0,3					
	Coliformes		NE	2,9	NE	0,0	0,6					
	<i>E. coli</i>			6,0		0,0	0,0					
13-01-2014	CT		4,7	2,3	4,7			0,9				
	Coliformes		NE	NE	5,7	NE	NE	0,3				
	<i>E. coli</i>				17,2			0,4				
14-01-2014	CT		8,0	5,0	1,0	2,0		1,3				
	Coliformes		NE	NE	NE	NE	NE	0,0				
	<i>E. coli</i>							0,0				
15-01-2014	CT			1,7	5,1			0,3				
	Coliformes		NE	NE	NE	NE	NE	0,0				
	<i>E. coli</i>							0,0				
16-01-2014	CT					1,7	0,5	0,0				
	Coliformes			NE	NE			0,0				
	<i>E. coli</i>					NE	NE	0,0				
17-01-2014	CT			4,9	3,4	2,0	1,3	0,9				
	Coliformes			NE	NE	NE	0,0	0,3				
	<i>E. coli</i>						0,0	0,0				
20-01-2014	CT			5,8	5,0	3,2	2,8	1,9				
	Coliformes			NE	NE	NE	NE	0,4				
	<i>E. coli</i>							0,6				
21-01-2014	CT			3,5	3,3	2,3	0,4	0,4	0,1			
	Coliformes			NE	2,2	NE	NE	0,1	0,1			
	<i>E. coli</i>				4,5			0,0	0,0			
22-01-2014	CT			7,3	4,8	4,8	1,8	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Coliformes			3,0	2,2	NE	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>			8,1	2,2		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23-01-2014	CT			11,6	7,1	1,3	1,0	1,3	1,0	0,3	0,0	0,0
	Coliformes			20,7	8,7	1,3	1,3	0,7	0,0	0,7	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>			10,3	7,3	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24-01-2014	CT			2,3	4,3	1,8	0,5	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0
	Coliformes			NE	5,6	1,9	NE	NE	0,0	0,4	0,4	0,0
	<i>E. coli</i>				5,6	1,7			0,0	0,0	0,0	0,0
27-01-2014	CT			8,0	5,0	1,6	1,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	Coliformes			5,3	5,2	NE	0,7	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>			6,3	5,3		0,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
28-01-2014	CT			2,1	4,9	2,5	0,2	1,0	0,5	0,4	0,1	0,0
	Coliformes			NE	4,3	1,3	NE	1,0	0,3	0,0	0,2	0,0
	<i>E. coli</i>				6,4	1,5		0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
29-01-2014	CT			2,3	1,0	1,5	0,5	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0
	Coliformes			2,8	1,3	NE	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>			6,2	2,3		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30-01-2014	CT				1,2	1,5	1,2	0,7	0,3	0,1	0,0	0,0
	Coliformes				0,6	NE	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>				0,5		0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
31-01-2014	CT				2,4	3,8	1,3	0,4	0,6	0,2	0,1	0,0
	Coliformes				NE	0,9	NE	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0
	<i>E. coli</i>					0,9		0,2	0,0	0,0	0,0	0,0

Legenda:



Não efetuado confirmação da placa;



Não Determinado por motivos de ordem técnica.

## Anexo D. Tabelas de duplicados

**Tabela 25 - Valores de duplicados de Gama baixa para bactérias coliformes e *E. coli*.**

Data	Volume	Análise de bactérias coliformes			Análise de <i>E. coli</i>		
		Duplicado 1	Duplicado 2	Rlog i	Duplicado 1	Duplicado 2	Rlog i
12-12-2013	100	19	18	0,023	18	12	0,176
12-12-2013	10	2	1	0,301	1	1	0,000
12-12-2013	1	1	0	0,352	1	0	0,352
12-12-2013	1	0	0	0,000	0	0	0,000
12-12-2013	100	3	4	0,125	3	3	0,000
12-12-2013	10	0	0	0,000	0	0	0,000
12-12-2013	1	0	0	0,000	0	0	0,000
12-12-2013	100	5	4	0,097	2	1	0,301
12-12-2013	10	0	0	0,000	0	0	0,000
12-12-2013	1	0	0	0,000	0	0	0,000
17-12-2013	50	6	5	0,079	2	1	0,301
17-12-2013	50	4	3	0,125	2	1	0,301
17-12-2013	50	0	1	0,352	0	1	0,352
17-12-2013	50	0	0	0,000	0	0	0,000
17-12-2013	50	15	14	0,030	15	14	0,030
18-12-2013	50	11	7	0,196	8	6	0,125
18-12-2013	100	16	19	0,075	14	18	0,109
18-12-2013	50	11	7	0,196	11	6	0,263
18-12-2013	100	16	19	0,075	14	17	0,084
19-12-2013	10	10	8	0,097	9	6	0,176
19-12-2013	10	6	7	0,067	5	3	0,222
08-01-2014	10	9	9	0,000	9	9	0,000
08-01-2014	10	4	3	0,125	2	1	0,301
08-01-2014	10	9	8	0,051	9	6	0,176
08-01-2014	10	1	0	0,352	0	0	0,004
09-01-2014	10	4	6	0,176	3	5	0,222
09-01-2014	10	8	7	0,058	8	5	0,204
09-01-2014	10	12	6	0,301	10	6	0,222
09-01-2014	10	5	3	0,222	5	2	0,398
09-01-2014	10	5	6	0,079	5	4	0,097
09-01-2014	10	2	2	0,000	2	1	0,301
09-01-2014	10	0	0	0,000	0	0	0,000
09-01-2014	10	3	5	0,222	3	4	0,125
10-01-2014	10	2	1	0,301	2	1	0,301
10-01-2014	10	3	2	0,176	1	2	0,301
10-01-2014	100	7	15	0,331	7	12	0,234
13-01-2014	10	3	1	0,477	3	2	0,176
13-01-2014	10	1	1	0,000	1	1	0,000
13-01-2014	100	7	8	0,058	6	8	0,125
13-01-2014	100	3	6	0,301	3	4	0,125
14-01-2014	10	0	0	0,000	0	0	0,000
14-01-2014	100	9	8	0,051	6	8	0,125
15-01-2014	10	1	0	0,352	1	0	0,352
15-01-2014	100	4	4	0,000	3	4	0,125
23-01-2014	10	2	1	0,301	2	1	0,301
23-01-2014	100	6	5	0,079	6	3	0,301
23-01-2014	100	2	2	0,000	2	1	0,301
23-01-2014	100	1	1	0,000	0	1	0,357
23-01-2014	100	14	12	0,067	12	9	0,125
23-01-2014	100	1	2	0,301	1	2	0,301
23-01-2014	100	2	2	0,000	1	1	0,000
23-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
24-01-2014	100	2	1	0,301	1	1	0,000
24-01-2014	100	2	1	0,301	2	1	0,301
27-01-2014	100	1	1	0,000	0	1	0,357
27-01-2014	100	1	2	0,301	1	2	0,301
27-01-2014	100	1	0	0,352	0	0	0,004
27-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
27-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
28-01-2014	100	6	6	0,000	5	4	0,097
28-01-2014	100	1	3	0,477	1	2	0,301
28-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
28-01-2014	1	8	4	0,301	6	4	0,176
29-01-2014	100	1	0	0,352	1	0	0,352
29-01-2014	100	3	1	0,477	3	2	0,176
29-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
29-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
29-01-2014	100	1	2	0,301	1	2	0,301
29-01-2014	100	1	3	0,477	1	2	0,301
30-01-2014	100	1	0	0,352	0	0	0,004
30-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
30-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
30-01-2014	100	4	3	0,125	3	3	0,000
30-01-2014	100	1	3	0,477	1	2	0,301
31-01-2014	100	3	3	0,000	2	3	0,176
31-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
31-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
31-01-2014	100	0	0	0,000	0	0	0,000
31-01-2014	100	7	16	0,359	6	14	0,368
31-01-2014	100	4	8	0,301	3	7	0,368
31-01-2014	100	3	3	0,000	3	3	0,000

**Tabela 26 - Valores de duplicados de Gama baixa para bactérias coliformes e *E. coli*.**

Data	Volume	Análise de coliformes			Análise de <i>E. coli</i>		
		Duplicado 1	Duplicado 2	Rlog i	Duplicado 1	Duplicado 2	LIR
12-12-2013	100	27	21	0,109	27	18	0,176
17-12-2013	50	25	31	0,093	22	28	0,105
17-12-2013	50	28	25	0,049	28	25	0,049
19-12-2013	100	44	54	0,0893	44	54	0,089
19-12-2013	50	29	27	0,031	29	22	0,120
19-12-2013	100	46	37	0,095	40	33	0,084
10-01-2014	50	41	39	0,022	41	39	0,023
10-01-2014	50	36	38	0,023	36	38	0,024
10-01-2014	100	28	24	0,067	28	22	0,105

## Anexo E. Modelos Microgen™

### E.1. Testes e tabelas de cores.

*Tabela 27 - Testes e reações da galeria Gn-A (Adaptado de (MICROGEN, 2011)).*

Reação	Teste
Lisina	Descarboxilação da lisina.
Ornitina	Descarboxilação da ornitina.
H <sub>2</sub> S	Produção de S <sup>2-</sup> a partir do metabolismo.
Glucose	Produção de ácido a partir da fermentação e hidratos de carbono.
Manitol	
Xilose	
O.N.P.G	Hidrólise de O.N.P.G através da B-galactosidase.
Indol	Produção de Indol através do triptofano.
Urease	Produção de amónia pela ação da enzima urease.
V.P.	Produção de acetoina pela fermentação de glucose.
Citrato	Utilização de citrato como fonte de carbono.
TDA	Produção de ácido indolpirúvico através do triptofano.

*Tabela 28 - Testes e reações da galeria Gn-B (Adaptado de (MICROGEN, 2011)).*

Reação	Teste
Gelatina	Liquidificação de gelatina através de proteases.
Malonato	Inibição da conversão de ácido succínico para ácido fumárico.
Inositol	Teste de fermentação de Hidratos de carbono.
Sorbitol	
Ramnose	
Sucrose	
Lactose	
Arabinose	
Adonitol	
Rafinose	
Salicina	
Arginina	Conversão da arginina para a ornitina, amoníaco e CO <sub>2</sub> pela dihidrolase arginina.

**Microgen™ GN A ID**

Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reação	Lisina	Ornitina	H <sub>2</sub> S	Glucose	Manitol	Xilose	O.N.P.G.	Indol	Urease	V.P.	Citrato	T.D.A.	Nitrato
Positivo													
Negativo													

**Microgen™ GN B ID**

Poço	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24
Reação	Gelatina	Malonato	Inositol	Sorbitol	Ramnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Rafinose	Salicina	Arginina 24h	Arginina 48h
Positivo													
Negativo													

Legenda: Adicionar Reagentes apropriados antes da leitura; Sobrepor com óleo Mineral; Não sobrepor com óleo mineral se se tratar de um organismo oxidase positiva;

**Figura 20** - Indicação das cores dos testes de confirmação bioquímica (Adaptado de (MICROGEN, 2011)).

## E.2. Identificações Ciprofloxacina

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <i>E. coli</i>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4	6			5			0			0			3			4			0				
Octal Code: 46500340				Final Identification: <i>E. coli</i> - imc hve (97.41%)																							



GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <u>E. coli</u>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			7			6			0			0			4			6			0		
Octal Code: <u>47600460</u>				Final Identification: <u>E. coli - inactive</u> (52.07%)																							

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <u>E. coli</u>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			7			6			0			0			0			6			0		
Octal Code: <u>47600060</u>				Final Identification: <u>E. coli - inactive</u> (85%)																							

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <u>E. coli</u>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			7			5			6			1			7			2			6		
Octal Code: <u>Klebsiella pneumoniae (94.6%)</u>				Final Identification: <u>47561726</u>																							

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <i>C(6)</i>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			6			5			6			1			7			2			6		
Octal Code: 46561726				Final Identification: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (99,14%)																							
WF6125/08/03																											

### E.3. Identificações Estreptomicina

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <i>S(1)</i>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			2			6			0		
Octal Code: 67600260				Final Identification: <i>E. hermannii</i> (57,41%)																							
WF6125/08/03																											

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: <i>S(4)</i>																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			2			6			0		
Octal Code: 67600260				Final Identification: <i>E. hermannii</i> (57,41%)																							
WF6125/08/03																											

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: S(8)																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Aminina
Result				+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-		
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			7			6			0			0			2			6			0		
Octal Code: 47600260				Final Identification: <i>E. coli</i> -imcehve (72,3%)																							

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: S(2)																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Aminina
Result				-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-		
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				0			6			4			0			0			2			2			0		
Octal Code: 06400220				Final Identification: <i>Shigella sonnei</i> group (88,38%)																							

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM																											
Lab. No.				Specimen Type: S(10)																							
				Date:																							
Well Number				GN A wells												GN B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Aminina
Result				+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-		
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				4			7			4			0			2			6			3			0		
Octal Code: 42402630				Final Identification: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (88,08%)																							

E.4. Exemplos *Output software* Microgen™-ID

Microgen ID																																																																																																					
Microgen GNA + B Oxidase Negative																																																																																																					
<b>Specimen Details</b> Lab Ref: _____ Name: _____ Specimen Type: _____ Source (ward/location): _____			Date: 15-03-2014																																																																																																		
<b>Results Entry</b> Octal Code: 0640020 <table border="0"> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>+ ORN Ornithine Decarboxylase</td> <td>+ H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>+ GLU Acid from Glucose</td> <td>+ MAN Acid from Mannitol</td> <td>+ XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>+ ONP ONPG</td> <td>+ IND Indole</td> <td>+ UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>+ VP Voges Proskauer</td> <td>+ CIT Citrate Utilization</td> <td>+ TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>+ GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>+ MAL Malonate Utilization</td> <td>+ INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>+ SOR Acid from Sorbitol</td> <td>+ RHA Acid from Rhamnose</td> <td>+ SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>+ LAC Acid from Lactose</td> <td>+ ARA Acid from Arabinose</td> <td>+ ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>+ RAF Acid from Raffinose</td> <td>+ SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>						+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production	+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose	+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis	+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase	+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol	+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose	+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol	+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																								
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production																																																																																																			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose																																																																																																			
+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis																																																																																																			
+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase																																																																																																			
+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol																																																																																																			
+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose																																																																																																			
+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol																																																																																																			
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																																			
<b>Identification Analysis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Select ID Choice</th> <th>Shigella (Group D)</th> <th>Enterobacteriaceae</th> <th>Escherichia</th> <th>Shigella Serogroups A,B,C</th> <th>Escherichia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Probability</td> <td>99%</td> <td>101.376</td> <td>101.268</td> <td>111.267</td> <td>116.717</td> </tr> <tr> <td>Percent Probability</td> <td>98.38%</td> <td>54.1%</td> <td>42.8%</td> <td>6.7%</td> <td>6.5%</td> </tr> <tr> <td>Likelihood</td> <td>2.84%</td> <td>2.42%</td> <td>0.21%</td> <td>0.11%</td> <td>0.07%</td> </tr> <tr> <td>Human Isolate</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Tests against</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Test 1</td> <td>ORN (98%)</td> <td>IND (98%)</td> <td>XYL (95%)</td> <td>ONP (2%)</td> <td>RHA (7%)</td> </tr> <tr> <td>Test 2</td> <td>LAC (97%)</td> <td>LAC (97%)</td> <td>RHA (5%)</td> <td>XYL (99%)</td> <td>XYL (99%)</td> </tr> <tr> <td>Test 3</td> <td>H2S (98%)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additional Tests</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Acid from Trehalose</td> <td>99.2%</td> <td>98%</td> <td>6.1%</td> <td>88%</td> <td>96.9%</td> </tr> <tr> <td>Tartrate (25C)</td> <td>98%</td> <td>85%</td> <td>27%</td> <td>38%</td> <td>6.1%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Melibiose</td> <td>98%</td> <td>88%</td> <td>6.1%</td> <td>38%</td> <td>88%</td> </tr> <tr> <td>Esculin Hydrolysis</td> <td>8.3%</td> <td>5%</td> <td>6.1%</td> <td>6.1%</td> <td>58%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Dulcitol</td> <td>8.3%</td> <td>48%</td> <td>6.1%</td> <td>2%</td> <td>6.1%</td> </tr> <tr> <td>Additional Comments</td> <td>21</td> <td>25</td> <td></td> <td>25</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>21 Previously the Alkaline Diaper (ADO) Group 25 Shigella species cannot be identified using biochemical alone, perform serology to confirm the species type</p>						Select ID Choice	Shigella (Group D)	Enterobacteriaceae	Escherichia	Shigella Serogroups A,B,C	Escherichia	Probability	99%	101.376	101.268	111.267	116.717	Percent Probability	98.38%	54.1%	42.8%	6.7%	6.5%	Likelihood	2.84%	2.42%	0.21%	0.11%	0.07%	Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Tests against						Test 1	ORN (98%)	IND (98%)	XYL (95%)	ONP (2%)	RHA (7%)	Test 2	LAC (97%)	LAC (97%)	RHA (5%)	XYL (99%)	XYL (99%)	Test 3	H2S (98%)					Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Acid from Trehalose	99.2%	98%	6.1%	88%	96.9%	Tartrate (25C)	98%	85%	27%	38%	6.1%	Acid from Melibiose	98%	88%	6.1%	38%	88%	Esculin Hydrolysis	8.3%	5%	6.1%	6.1%	58%	Acid from Dulcitol	8.3%	48%	6.1%	2%	6.1%	Additional Comments	21	25		25	
Select ID Choice	Shigella (Group D)	Enterobacteriaceae	Escherichia	Shigella Serogroups A,B,C	Escherichia																																																																																																
Probability	99%	101.376	101.268	111.267	116.717																																																																																																
Percent Probability	98.38%	54.1%	42.8%	6.7%	6.5%																																																																																																
Likelihood	2.84%	2.42%	0.21%	0.11%	0.07%																																																																																																
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes																																																																																																
Tests against																																																																																																					
Test 1	ORN (98%)	IND (98%)	XYL (95%)	ONP (2%)	RHA (7%)																																																																																																
Test 2	LAC (97%)	LAC (97%)	RHA (5%)	XYL (99%)	XYL (99%)																																																																																																
Test 3	H2S (98%)																																																																																																				
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																																
Acid from Trehalose	99.2%	98%	6.1%	88%	96.9%																																																																																																
Tartrate (25C)	98%	85%	27%	38%	6.1%																																																																																																
Acid from Melibiose	98%	88%	6.1%	38%	88%																																																																																																
Esculin Hydrolysis	8.3%	5%	6.1%	6.1%	58%																																																																																																
Acid from Dulcitol	8.3%	48%	6.1%	2%	6.1%																																																																																																
Additional Comments	21	25		25																																																																																																	
<b>Identification Comments</b> Acceptable Identification of <i>Shigella sonnei</i> (Group D) The strain is not typical (one or more tests may be against), although it is well separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.																																																																																																					

Microgen ID																																																																																																					
Microgen GNA + B Oxidase Negative																																																																																																					
<b>Specimen Details</b> Lab Ref: _____ Name: _____ Specimen Type: _____ Source (ward/location): _____			Date: 15-03-2014																																																																																																		
<b>Results Entry</b> Octal Code: 4650040 <table border="0"> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>+ ORN Ornithine Decarboxylase</td> <td>+ H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>+ GLU Acid from Glucose</td> <td>+ MAN Acid from Mannitol</td> <td>+ XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>+ ONP ONPG</td> <td>+ IND Indole</td> <td>+ UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>+ VP Voges Proskauer</td> <td>+ CIT Citrate Utilization</td> <td>+ TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>+ GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>+ MAL Malonate Utilization</td> <td>+ INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>+ SOR Acid from Sorbitol</td> <td>+ RHA Acid from Rhamnose</td> <td>+ SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>+ LAC Acid from Lactose</td> <td>+ ARA Acid from Arabinose</td> <td>+ ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>+ RAF Acid from Raffinose</td> <td>+ SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>						+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production	+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose	+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis	+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase	+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol	+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose	+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol	+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																								
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production																																																																																																			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose																																																																																																			
+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis																																																																																																			
+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase																																																																																																			
+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol																																																																																																			
+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose																																																																																																			
+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol																																																																																																			
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																																			
<b>Identification Analysis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Select ID Choice</th> <th>Escherichia</th> <th>Escherichia complex</th> <th>Escherichia</th> <th>Escherichia</th> <th>Escherichia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Probability</td> <td>101.992.683</td> <td>No</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> </tr> <tr> <td>Percent Probability</td> <td>97.41%</td> <td>1.0%</td> <td>0.04%</td> <td>0.03%</td> <td>0.02%</td> </tr> <tr> <td>Likelihood</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> </tr> <tr> <td>Human Isolate</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>No</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Tests against</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Test 1</td> <td>UR (1%)</td> <td>LYS (6.1%)</td> <td>LYS (6.1%)</td> <td>ORN (98%)</td> <td>ARA (98%)</td> </tr> <tr> <td>Test 2</td> <td>SUC (18%)</td> <td>ARA (98%)</td> <td>SUC (6.1%)</td> <td>XYL (98%)</td> <td>ADO (97%)</td> </tr> <tr> <td>Test 3</td> <td>ARA (98%)</td> <td>XYL (98%)</td> <td>XYL (99%)</td> <td>UR (6%)</td> <td>SAL (97%)</td> </tr> <tr> <td>Additional Tests</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Acid from Trehalose</td> <td>98%</td> <td>98%</td> <td>6.1%</td> <td>98%</td> <td>98%</td> </tr> <tr> <td>Maltitol (17C)</td> <td>8%</td> <td>8%</td> <td>27%</td> <td>88%</td> <td>8.1%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Cellulose</td> <td>2%</td> <td>58%</td> <td>6.1%</td> <td>27%</td> <td>92%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Melibiose</td> <td>40%</td> <td>58%</td> <td>6.1%</td> <td>6.1%</td> <td>98%</td> </tr> <tr> <td>Esculin Hydrolysis</td> <td>1%</td> <td>40%</td> <td>6.1%</td> <td>7%</td> <td>88%</td> </tr> <tr> <td>Additional Comments</td> <td>21</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>21 Previously the Alkaline Diaper (ADO) Group</p>						Select ID Choice	Escherichia	Escherichia complex	Escherichia	Escherichia	Escherichia	Probability	101.992.683	No	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	Percent Probability	97.41%	1.0%	0.04%	0.03%	0.02%	Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Tests against						Test 1	UR (1%)	LYS (6.1%)	LYS (6.1%)	ORN (98%)	ARA (98%)	Test 2	SUC (18%)	ARA (98%)	SUC (6.1%)	XYL (98%)	ADO (97%)	Test 3	ARA (98%)	XYL (98%)	XYL (99%)	UR (6%)	SAL (97%)	Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Acid from Trehalose	98%	98%	6.1%	98%	98%	Maltitol (17C)	8%	8%	27%	88%	8.1%	Acid from Cellulose	2%	58%	6.1%	27%	92%	Acid from Melibiose	40%	58%	6.1%	6.1%	98%	Esculin Hydrolysis	1%	40%	6.1%	7%	88%	Additional Comments	21				
Select ID Choice	Escherichia	Escherichia complex	Escherichia	Escherichia	Escherichia																																																																																																
Probability	101.992.683	No	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000																																																																																																
Percent Probability	97.41%	1.0%	0.04%	0.03%	0.02%																																																																																																
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%																																																																																																
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	Yes																																																																																																
Tests against																																																																																																					
Test 1	UR (1%)	LYS (6.1%)	LYS (6.1%)	ORN (98%)	ARA (98%)																																																																																																
Test 2	SUC (18%)	ARA (98%)	SUC (6.1%)	XYL (98%)	ADO (97%)																																																																																																
Test 3	ARA (98%)	XYL (98%)	XYL (99%)	UR (6%)	SAL (97%)																																																																																																
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																																
Acid from Trehalose	98%	98%	6.1%	98%	98%																																																																																																
Maltitol (17C)	8%	8%	27%	88%	8.1%																																																																																																
Acid from Cellulose	2%	58%	6.1%	27%	92%																																																																																																
Acid from Melibiose	40%	58%	6.1%	6.1%	98%																																																																																																
Esculin Hydrolysis	1%	40%	6.1%	7%	88%																																																																																																
Additional Comments	21																																																																																																				
<b>Identification Comments</b> Acceptable Identification of <i>Escherichia coli</i> - inactive The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.																																																																																																					

Microgen ID																																																																																															
Microgen GNA + B Oxidase Negative																																																																																															
<b>Specimen Details</b> Lab Ref: _____ Name: _____ Specimen Type: _____ Source (ward/location): _____			Date: 15-03-2014																																																																																												
<b>Results Entry</b> Octal Code: 46561726 <table border="0"> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>+ ORN Ornithine Decarboxylase</td> <td>+ H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>+ GLU Acid from Glucose</td> <td>+ MAN Acid from Mannitol</td> <td>+ XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>+ ONP ONPG</td> <td>+ IND Indole</td> <td>+ UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>+ VP Voges Proskauer</td> <td>+ CIT Citrate Utilization</td> <td>+ TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>+ GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>+ MAL Malonate Utilization</td> <td>+ INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>+ SOR Acid from Sorbitol</td> <td>+ RHA Acid from Rhamnose</td> <td>+ SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>+ LAC Acid from Lactose</td> <td>+ ARA Acid from Arabinose</td> <td>+ ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>+ RAF Acid from Raffinose</td> <td>+ SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>						+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production	+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose	+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis	+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase	+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol	+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose	+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol	+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																		
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production																																																																																													
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose																																																																																													
+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis																																																																																													
+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase																																																																																													
+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol																																																																																													
+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose																																																																																													
+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol																																																																																													
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																													
<b>Identification Analysis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Select ID Choice</th> <th>Klebsiella</th> <th>Shigella</th> <th>Escherichia complex</th> <th>Escherichia</th> <th>Shigella flexneri</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Probability</td> <td>101.712</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> <td>No</td> </tr> <tr> <td>Percent Probability</td> <td>99.14%</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> </tr> <tr> <td>Likelihood</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> </tr> <tr> <td>Human Isolate</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Tests against</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Test 1</td> <td>XYL (99%)</td> <td>XYL (99.9%)</td> <td>LYS (6.1%)</td> <td>VP (6.1%)</td> <td>ORN (99.9%)</td> </tr> <tr> <td>Test 2</td> <td>LAC (98%)</td> <td>UR (7%)</td> <td>XYL (97%)</td> <td>ADO (97%)</td> <td>XYL (99.9%)</td> </tr> <tr> <td>Test 3</td> <td>MAL (93%)</td> <td>ORN (95%)</td> <td>IND (15%)</td> <td>XYL (95%)</td> <td>UR (5%)</td> </tr> <tr> <td>Additional Tests</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Maltitol (17C)</td> <td>8.1%</td> <td>95%</td> <td>85%</td> <td>6.1%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>D-Nase (25C)</td> <td>8.1%</td> <td>85%</td> <td>6.1%</td> <td>6.1%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>Methyl Red</td> <td>10%</td> <td>93%</td> <td>58%</td> <td>98%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Cellulose</td> <td>98%</td> <td>5%</td> <td>55%</td> <td>92%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>Additional Comments</td> <td>47</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>47 Previously Enterobacteriaceae, Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23: 217-225</p>						Select ID Choice	Klebsiella	Shigella	Escherichia complex	Escherichia	Shigella flexneri	Probability	101.712	No	No	No	No	Percent Probability	99.14%	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Tests against						Test 1	XYL (99%)	XYL (99.9%)	LYS (6.1%)	VP (6.1%)	ORN (99.9%)	Test 2	LAC (98%)	UR (7%)	XYL (97%)	ADO (97%)	XYL (99.9%)	Test 3	MAL (93%)	ORN (95%)	IND (15%)	XYL (95%)	UR (5%)	Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Maltitol (17C)	8.1%	95%	85%	6.1%	99.9%	D-Nase (25C)	8.1%	85%	6.1%	6.1%	99.9%	Methyl Red	10%	93%	58%	98%	99.9%	Acid from Cellulose	98%	5%	55%	92%	99.9%	Additional Comments	47				
Select ID Choice	Klebsiella	Shigella	Escherichia complex	Escherichia	Shigella flexneri																																																																																										
Probability	101.712	No	No	No	No																																																																																										
Percent Probability	99.14%	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000																																																																																										
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%																																																																																										
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																										
Tests against																																																																																															
Test 1	XYL (99%)	XYL (99.9%)	LYS (6.1%)	VP (6.1%)	ORN (99.9%)																																																																																										
Test 2	LAC (98%)	UR (7%)	XYL (97%)	ADO (97%)	XYL (99.9%)																																																																																										
Test 3	MAL (93%)	ORN (95%)	IND (15%)	XYL (95%)	UR (5%)																																																																																										
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																										
Maltitol (17C)	8.1%	95%	85%	6.1%	99.9%																																																																																										
D-Nase (25C)	8.1%	85%	6.1%	6.1%	99.9%																																																																																										
Methyl Red	10%	93%	58%	98%	99.9%																																																																																										
Acid from Cellulose	98%	5%	55%	92%	99.9%																																																																																										
Additional Comments	47																																																																																														
<b>Identification Comments</b> Acceptable Identification of <i>Klebsiella pneumoniae</i> The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.																																																																																															

Microgen ID																																																																																																					
Microgen GNA + B Oxidase Negative																																																																																																					
<b>Specimen Details</b> Lab Ref: _____ Name: _____ Specimen Type: _____ Source (ward/location): _____			Date: 15-03-2014																																																																																																		
<b>Results Entry</b> Octal Code: 4760060 <table border="0"> <tr> <td>+ LYS Lysine Decarboxylase</td> <td>+ ORN Ornithine Decarboxylase</td> <td>+ H2S H2S Production</td> </tr> <tr> <td>+ GLU Acid from Glucose</td> <td>+ MAN Acid from Mannitol</td> <td>+ XYL Acid from Xylose</td> </tr> <tr> <td>+ ONP ONPG</td> <td>+ IND Indole</td> <td>+ UR Urea Hydrolysis</td> </tr> <tr> <td>+ VP Voges Proskauer</td> <td>+ CIT Citrate Utilization</td> <td>+ TDA Tryptophan Deaminase</td> </tr> <tr> <td>+ GEL Gelatin Liquefaction</td> <td>+ MAL Malonate Utilization</td> <td>+ INO Acid from Inositol</td> </tr> <tr> <td>+ SOR Acid from Sorbitol</td> <td>+ RHA Acid from Rhamnose</td> <td>+ SUC Acid from Sucrose</td> </tr> <tr> <td>+ LAC Acid from Lactose</td> <td>+ ARA Acid from Arabinose</td> <td>+ ADO Acid from Adonitol</td> </tr> <tr> <td>+ RAF Acid from Raffinose</td> <td>+ SAL Acid from Salicin</td> <td>+ ARG Arginine Dihydrolase</td> </tr> </table>						+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production	+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose	+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis	+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase	+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol	+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose	+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol	+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																								
+ LYS Lysine Decarboxylase	+ ORN Ornithine Decarboxylase	+ H2S H2S Production																																																																																																			
+ GLU Acid from Glucose	+ MAN Acid from Mannitol	+ XYL Acid from Xylose																																																																																																			
+ ONP ONPG	+ IND Indole	+ UR Urea Hydrolysis																																																																																																			
+ VP Voges Proskauer	+ CIT Citrate Utilization	+ TDA Tryptophan Deaminase																																																																																																			
+ GEL Gelatin Liquefaction	+ MAL Malonate Utilization	+ INO Acid from Inositol																																																																																																			
+ SOR Acid from Sorbitol	+ RHA Acid from Rhamnose	+ SUC Acid from Sucrose																																																																																																			
+ LAC Acid from Lactose	+ ARA Acid from Arabinose	+ ADO Acid from Adonitol																																																																																																			
+ RAF Acid from Raffinose	+ SAL Acid from Salicin	+ ARG Arginine Dihydrolase																																																																																																			
<b>Identification Analysis</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Select ID Choice</th> <th>Escherichia</th> <th>Escherichia</th> <th>Escherichia</th> <th>Escherichia complex</th> <th>Escherichia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Probability</td> <td>1/1.226</td> <td>16.957</td> <td>16.583.192</td> <td>1/84.378.026</td> <td>&lt; 1/100,000,000</td> </tr> <tr> <td>Percent Probability</td> <td>85%</td> <td>14.98%</td> <td>0.02%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> </tr> <tr> <td>Likelihood</td> <td>3.26%</td> <td>0.29%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> <td>&lt;0.01%</td> </tr> <tr> <td>Human Isolate</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Tests against</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Test 1</td> <td>SOR (94%)</td> <td>ORN (99.9%)</td> <td>LYS (6.1%)</td> <td>IND (0.1%)</td> <td>IND (0.1%)</td> </tr> <tr> <td>Test 2</td> <td>ORN (83%)</td> <td>RHA (97%)</td> <td>RHA (85%)</td> <td>RAI (99%)</td> <td>RAI (99%)</td> </tr> <tr> <td>Test 3</td> <td>RHA (100%)</td> <td>LYS (98%)</td> <td>LYS (98%)</td> <td>RHA (93%)</td> <td>RHA (93%)</td> </tr> <tr> <td>Additional Tests</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> <td>Yes</td> </tr> <tr> <td>Maltitol (17C)</td> <td>5%</td> <td>99%</td> <td>99%</td> <td>85%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Cellulose</td> <td>2%</td> <td>2%</td> <td>97%</td> <td>55%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Melibiose</td> <td>40%</td> <td>75%</td> <td>6.1%</td> <td>50%</td> <td>99.9%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Dulcitol</td> <td>40%</td> <td>60%</td> <td>19%</td> <td>15%</td> <td>0.1%</td> </tr> <tr> <td>Acid from Glycerol</td> <td>65%</td> <td>75%</td> <td>3%</td> <td>30%</td> <td>25%</td> </tr> <tr> <td>Additional Comments</td> <td>21</td> <td></td> <td>23</td> <td></td> <td>24</td> </tr> </tbody> </table> <p>21 Previously the Alkaline Diaper (ADO) Group 23 Original citation: J. Clin. Microbiol. (1982) 15: 703-713 24 Original citation: J. Clin. Microbiol. (1982) 15: 1113-1140</p>						Select ID Choice	Escherichia	Escherichia	Escherichia	Escherichia complex	Escherichia	Probability	1/1.226	16.957	16.583.192	1/84.378.026	< 1/100,000,000	Percent Probability	85%	14.98%	0.02%	<0.01%	<0.01%	Likelihood	3.26%	0.29%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Tests against						Test 1	SOR (94%)	ORN (99.9%)	LYS (6.1%)	IND (0.1%)	IND (0.1%)	Test 2	ORN (83%)	RHA (97%)	RHA (85%)	RAI (99%)	RAI (99%)	Test 3	RHA (100%)	LYS (98%)	LYS (98%)	RHA (93%)	RHA (93%)	Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Maltitol (17C)	5%	99%	99%	85%	99.9%	Acid from Cellulose	2%	2%	97%	55%	99.9%	Acid from Melibiose	40%	75%	6.1%	50%	99.9%	Acid from Dulcitol	40%	60%	19%	15%	0.1%	Acid from Glycerol	65%	75%	3%	30%	25%	Additional Comments	21		23		24
Select ID Choice	Escherichia	Escherichia	Escherichia	Escherichia complex	Escherichia																																																																																																
Probability	1/1.226	16.957	16.583.192	1/84.378.026	< 1/100,000,000																																																																																																
Percent Probability	85%	14.98%	0.02%	<0.01%	<0.01%																																																																																																
Likelihood	3.26%	0.29%	<0.01%	<0.01%	<0.01%																																																																																																
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																																
Tests against																																																																																																					
Test 1	SOR (94%)	ORN (99.9%)	LYS (6.1%)	IND (0.1%)	IND (0.1%)																																																																																																
Test 2	ORN (83%)	RHA (97%)	RHA (85%)	RAI (99%)	RAI (99%)																																																																																																
Test 3	RHA (100%)	LYS (98%)	LYS (98%)	RHA (93%)	RHA (93%)																																																																																																
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes																																																																																																
Maltitol (17C)	5%	99%	99%	85%	99.9%																																																																																																
Acid from Cellulose	2%	2%	97%	55%	99.9%																																																																																																
Acid from Melibiose	40%	75%	6.1%	50%	99.9%																																																																																																
Acid from Dulcitol	40%	60%	19%	15%	0.1%																																																																																																
Acid from Glycerol	65%	75%	3%	30%	25%																																																																																																
Additional Comments	21		23		24																																																																																																
<b>Identification Comments</b> Acceptable Identification of <i>Escherichia coli</i> - inactive The strain is not typical (one or more tests may be against), although it is well separated from other suggested identification choices ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.																																																																																																					